Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Hautkarzinomen

von Heinz Münnich aus Nürnberg

Aus der Universitätshautklinik E r l a n g e n

Direktor: Professor Dr.med. C.M. Hasselmann

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Hautkarzinomen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

E r l a n g e n

vorgelegt von

Heinz Münnich

aus Nürnberg

1962

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der

Universität E r l a n g e n

Dekan: Prof.Dr.med. A. Windorfer

Referent: Prof.Dr.med. C.M. Hasselmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 1962

Aus dem Inhalt

Einführung und historischer Überblick

Eigene Untersuchungen

Hilfsmittel und Methodik

- Mikroskop und Hilfsapparate
- Methodik der Materialgewinnung
- Färbemethoden und Farbstoffe
  - Panoptische Färbung
  - Fluorochromierung mit Acridinfarbstoffen
    - Allgemeines über Acridinfarbstoffe
    - Histol. Acridinorangefluorochromierung
    - Cytol. Acridinorangefluorochromierung
    - Intravitale Atebrinfluorochromierung
- Grundlagen der Beurteilung

Untersuchungsmaterial (Fälle)

Befunde und Ergebnisse

- Normale und entzündlich veränderte Haut
- Morphologie der Hautkarzinome
  - Cytol. panoptisch gefärbte Präparate
  - Cytol. acridinorangefluorochromierte Präparate
  - Cytol. atebrinfluorochromierte Präparate
  - Histol. acridinorangefluorochromierte Präparate
- Untersuchungsergebnisse und Auswertung
  - Panoptisch gefärbte Präparate
  - Cytol. atebrinfluorochromierte Präparate
  - Cytol. acridinorangefluorochromierte Präparate
  - Histol. acridinorangefluorochromierte Präparate

Diskussion

Zusammenfassung

Schrifttum

Der kontinuierliche Anstieg der Krebstodesfälle, die zur Zeit an zweiter Stelle der Todesursachen direkt hinter den Herz- und Gefäßschäden rangieren, hat naturgemäß zu einer weltweiten Intensivierung im Ausbau der Krebstherapie und Krebsdiagnostik geführt. Insbesondere wurde und wird versucht, die Methoden der Früherkennung des Krebses immer mehr zu verbessern und es wurden auf diesem Gebiet schon erfreuliche Erfolge erzielt (zusammenfassend bei K. H. BAUER u. LINKE (59)).

Aufgrund von unzähligen, empirisch zusammengetragenen Beobachtungen läßt sich ein bestimmter Krebs heutzutage, vorausgesetzt, daß er ein gewisses Stadium erreicht hat, klinisch wohl meist erkennen und mehr oder weniger erfolgreich behandeln.

Auf der Suche nach der Aetiologie des Krebses oder einem charakteristischen morphologischen, cytologischen oder biochemischen Kennzeichen des Krebsgewebes und insbesondere der einzelnen Krebszelle ist uns leider noch kein definitiver Erfolg beschieden. (SCHÜMMELFEDER (84), DOMAGK (22) u.a.). Als sicherster und bis heute endgültiger Beweis von Tumorgewebe verbleibt die histoligische Untersuchung, da sie die Möglichkeit bietet, die bekannten Geschwulstkriterien wie das Verhalten zum ortsständigen Gewebe, die feingewebliche Struktur und cytologische Kennzeichen der Einzelzelle etc. in einem Dauerpraeparat gleichzeitig zu beurteilen (SCHÜMMELFEDER (82), HAMPERL (42), BAUER u. LINKE (59), WITT (101) u.a.). Allerdings ist die Entnahme eines für die histologische Untersuchung genügend großen Gewebsstückes oft schwierig oder mitunter sogar unmöglich und stellt vielleicht unter Umständen für den Patienten eine große Belastung dar. Auch die entsprechende Verarbeitung des Untersuchungsmaterials kann kompliziert und zeitraubend sein. Deshalb wurde versucht, mit anderen Untersuchungsmethoden diese Nachteile der seitherigen histologischen Methodik auszugleichen. Neben serologischen, biochemischen und histochemischen Nachweisversuchen (SCHÜMMELFEDER (85), WARBURG (98), Übersichten bei BUTENANDT u. DANNENBERG (16) u. SANDRITTER (75)) entwickelte sich, auf die Untersuchungen WIDAL'S, QUENSEL'S und ARNIKIN'S aufbauend, die

Cytodiagnostik der Tumoren, insbesondere durch die bahnbrechenden und richtungsweisenden Arbeiten PAPANICOLAOU'S (68) und seiner Mitarbeiter. Die Einführung der Phasenkontrastmikroskopie durch ZERNICKE im Jahre 1937 bot zudem die Möglichkeit der Vitalbeobachtung der Krebszelle ohne die vorherige Einwirkung von zellschädigenden Medien.

Durch die nach ihm benannte überaus günstige Fixierungs- und Färbemethode war es ja PAPANICOLAOU zusammen mit TRAUT möglich, die schon früher von anderen Autoren (LIPSCHÜTZ 1931 (60) u.a.) geschilderten Charakteristika der Krebszelle zusammenfassend darzustellen und zur Diagnose der weiblichen Genitalkarzinome heranzuziehen. Die oft abgewandelte Methode (z.B. AYRE (4)), die bei "vaginal smears" eine Treffsicherheit von 90 - 95 % erzielte, wurde auch bei anderen Karzinomen angewandt und diente jahrelang als cytologische Standardmethode und gewissermaßen als Maßstab für die Tauglichkeit oder Untauglichkeit anderer Untersuchungen (SCHÜMMELFEDER (82, 84)), obgleich andere Autoren (STREICHER-SANDKÜHLER (89), RIEGEL (70), GRUNZE (34)) die in der Blutmorphologie allgemein verwendete Panoptische Färbung bei bestimmten Geweben als gleichwertig oder sogar als besser, insbesondere in der Plasmabeurteilung, bezeichneten.

Eine Ergänzung zu der morphologischen Beurteilung von Geschwulstgewebe und Geschwulstzellen bzw. eine Kombination mit derselben stellen die Versuche dar, mithilfe färberisch sichtbar zu machender cyto- und histochemischer Eigenschaften der Tumorzelle eine Abgrenzung gegenüber "normalen" Zellen zu erzielen (STRAUS (88), SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (78, 82, 85)). Vorallem handelte es sich dabei um Farbreaktionen zum Nachweis von in der Tumorzelle vermehrt vorkommenden Fermenten und Nukleinsäuren.

Aufbauend auf die fundamentalen Arbeiten von HAITINGER (37), HAMPERL (36, 38, 39) und STRUGGER (90) über Fluoreszenzmikroskopie und Fluorochromierung an pflanzlichen und tierischen Geweben und Organismen und die Ergebnisse in der Erforschung von Eigen- und Sekundärfluoreszenz von lebendem und

totem Gewebe (HAMPERL (43), FLEGEL (26), SJÖSTRAND (87) u.a.) wurde in vielen medizinisch-biologischen Arbeitsgebieten die Fluorochromierung mit verschiedenen Fluorochromen näher untersucht und praktisch eingesetzt (HAMPERL (39), HAITINGER (36), GRAFFI (33), HAGEMANN (35), STRUGGER (90), SCHÜMMELFEDER (79, 80, 86), KOSENOW u. MAI (57) u.a.). Neben den Fluoresceinderivaten, neben Auramin (HAGEMANN (35)) und Benzpyren (HAMPERL, GRAFFI (33)) erwiesen sich die Acridinfarbstoffe und von ihnen besonders die basischen Fluorochrome Acridingelb und Acridinorange als sehr brauchbar, insbesondere zur Darstellung der Nucleinsäuren (STRUGGER (90), BUKATSCH u. HAITINGER (15), HAITINGER (37) u.a.).

Da die schon lange bekannte verstärkte Basophilie der Krebszellen (LIPSCHÜTZ 1931 (60)) nach CASPERSSON u.a. auf einem gesteigerten Gehalt an cytoplasmatischer Ribonukleinsäure (=RNS) beruht, der auch exakt nachgewiesen werden konnte (CASPERSSON u. SANTESSON (18)), lag es nahe, gerade die obengenannten basischen Farbstoffe in der Krebsdiagnostik einzusetzen. Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von SCHÜMMELFEDER (1948-50) und FLEGEL (1953/54 (28)) mit Acridinorange fand sich während der Untersuchung von tierischem Gewebe in Karzinomzellen oft eine auffällige Rotfluoreszenz des Cytoplasmas, die offensichtlich auf dem gesteigerten Gehalt an cytoplasmatischer RNS beruhte (SCHÜMMELFEDER (79, 80, 81)). Dieser gesteigerter RNS-Gehalt des Cytoplasmas der Krebszellen und seine Affinität zu Acridinorange wurde später von anderen Untersuchern bestätigt (ZEIGER u. Mitarb. (105, 106), GÖSSNER (31), DART u. TURNER (21), BERTALANFFY, BICKIS u. MASIN (12, 13), SCHNEIDER u. KLUG (76) u.a.). Es wurde von SCHÜMMELFEDER und FLEGEL vorgeschlagen, aufgrund der oben geschilderten Beobachtung die Acridinorangefluorochromierung in der Krebsdiagnostik einzusetzen und ihre Brauchbarkeit beim Nachweis von Tumorzellen zu überprüfen.

DART und TURNER haben 1955 auf dem Frühjahrskongress der International Academy of Pathology die Acridinorangefluorochromierung als eine vereinfachte Untersuchungsmethode

gegenüber der Papanicolaoufärbung zum Nachweis von Krebszellen beschrieben und ebenfalls auf eine im Fluoreszenzmikroskop zu beobachtende cytoplasmatische Rotfluoreszenz hingewiesen, die auf einem vermehrten Gehalt der Krebszellen an RNS beruht und sich scharf gegenüber den nicht oder nur schwach grünlich fluoreszierenden Zellen abhebt. Gleichzeitig schilderten sie eine gesteigerte Grünfluoreszenz der Zellkerne von Tumorzellen und führten dies auf den biochemisch exakt nachgewiesenen vermehrten Gehalt an Desoxyribonukleinsäure (=DNS) zurück (Zusammenfassung bei SWANSON (93)). Diese Phaenomene erlaubten nach Ansicht der Autoren eine rasche und zuverlässige Verdachtsdiagnose auf Krebs in Abstrichpräparaten.

Seit 1956 hat L. v. BERTALANFFY (6, 9, 11, 13) zusammen mit seinen Mitarbeitern die Acridinorangefluorochromierung in der cytologischen Krebsdiagnostik des weiblichen Genitalkarzinoms in zahlreichen Untersuchungen - bisher etwa 50 000 - angewandt und eindringlich empfohlen. Die cytoplasmatische Rotfluoreszenz der vermehrt RNS-haltigen Tumorzellen stellt nach L. v. u. F. D. BERTALANFFY (12, 6, 7) ein"Warnsignal" dar, das auch den ungeübten Untersuchern eine Verdachtsdiagnose erlauben soll, sodaß eventuell schon durch eine Hilfskraft aus einer Vielzahl von Ausstrichen "krebsverdächtige" Präparate abgesondert und dem Cytologen zur genaueren Untersuchung übergeben werden können (= "Prescreening").

Das von v. BERTALANFFY beschriebene Verfahren, das deutliche methodische Vorteile gegenüber der Papanicolaoufärbung aufweist, wurde von anderen Autoren aufgegriffen und führte zu einem Aufschwung der fluoreszenzmikroskopischen Cytodiagnostik (SUSSMANN (91), DART u. TURNER (21), UMICKER, PICKLE u. WAITE (95), MELLORS (63, 64), KERN, SCHÜMMELFEDER u. KERN-BONTKE (84), WITTEKIND (104) u.a.). Die Annahme BERTALANFFY's und einiger seiner Schüler (SUSSMANN (91), ELEVITCH u. BRUNSON (23)), daß die cytoplasmatische Rotfluoreszenz ein spezifisches Kennzeichen der Krebszelle darstellt, konnte leider nicht in vollem Umfang bestätigt werden. Auch andere Zellen mit gesteigertem Stoffwechsel und deshalb vermehrtem RNS-Ge-

halt des Cytoplasmas können Rotfluoreszenz verschiedener Farbtönung und Intensität zeigen und umgekehrt lassen Karzinomzellen unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei fortgeschrittener Autolyse, Rotfluoreszenz vermissen (SCHÜMMELFEDER (81), DART u. TURNER (21), UMICKER, PICKLE u. WAITE (95), SCHÜMMELFEDER, BONTKE u. KERN (84), HENNING u. WITTE (50) u.a.). Deshalb verzichteten manche Untersucher, besonders DART u. TURNER, weitgehend oder völlig auf das "Warnzeichen" der Rofluoreszenz und betonten neben den morphologischen Kennzeichen der Krebszelle die gesteigerte Fluoreszenz der Zellkerne, die auf einem gesteigerten DNS-Gehalt des Kerns beruht. Die Vorteile der Acridinorangefluorochromierung wie einfacher, kurzer Färbevorgang, geringe Farbstoffkonzentration, Möglichkeiten der Umfärbung, wie sie in Tabelle 1 genauer aufskizziert sind, wurden allgemein anerkannt, aber es wurde stets die zusätzliche genaue Beurteilung nach morphologischen Kriterien gefordert. Die fluoreszenzmikroskopische Cytodiagnostik wurde auch auf die Untersuchungen an extragenitalen Karzinomen übertragen, z. B. bei Bronchialkarzinomen, im Magen-Darm-Trakt und bei Peritonealkarzinomen (F. D. u. L. v. BERTALANFFY (10), HENNING u. WITTE (50), (103), KNOTH (54), MERENYI (65), SCHÖLDGEN (77), FLEGEL (27) u.a.).

Unter Heranziehung morphologischer Kriterien, besonders der aufgrund des hohen DNS-Gehaltes leuchtend grün fluoreszierenden Kerne, die im fluoreszenzmikroskopischen Bild auch morphologisch sehr gut zu beurteilen sind, erwies sich die Methode in der gynäkologischen Cytodiagnostik als genau so zuverlässig wie die konventionellen cytologischen Methoden (F.D. BERTALANFFY (7,8) u. L. v. BERTALANFFY (9), DART u. TURNER (21), HOLLAND u. ACKERMANN (51)). Bei bisher etwa 50 000 Untersuchungen mit der Acridinorangefluorochromierung wird von L. v. BERTALANFFY eine Treffsicherheit von 90 - 95 % angegeben (CHONÉ (19)). Die von anderen Untersuchern angegebenen Zahlen schwanken zwischen 40 und 90 %, wobei sich die schlechteren Ergebnisse besonders bei extragenitalen Karzinomen finden.

Tabelle 1:

Vorteile und Nachteile der Acridinorangefluorochromierung gegenüber anderen Färbe- und Fixierungsmethoden .

(Zusammenfassend nach BERTALANFFY, FLEGEL, SCHÜMMELFEDER, WITTEKIND, WITTE, DART u. TURNER)

V o r t e i l e :

1. Kurze, einfache Fixierung
2. Nur ein Färbevorgang

Schnelle Präparatherstellung
Kaum Färbefehler

3. Geringe, kaum schädigende Farbstoffkonzentration
4. Schnelles Auffinden der zu beurteilenden Zellen wegen leuchtender Fluoreszenzfarben in dunklem Gesichtsfeld
5. Schleim- und Blutbeimengungen stören nicht, da kaum oder nicht fluoreszierend
6. Präparate können nach Verwendung rasch entfärbt und evtl. umgefärbt oder wieder fluorochromiert werden
7. Entnahme der Präparate meist leicht und beliebig oft reproduzierbar (besonders gegenüber histol. Methoden)

N a c h t e i l e :

1. Bei längerer Beobachtung langsames Abblassen der leuchtenden Fluoreszenzfarben
2. Keine Dauerpräparate
3. Wegen evtl. Überstrahlung strukturelle Einzelheiten manchmal mit anderen Färbungen besser erkennbar
4. Untersucher muß dunkeladaptiert sein u. ermüdet leichter

Einen Schritt weiter in der Anwendung der Acridinfarbstoffe in der fluoreszenzmikroskopischen Diagnostik gingen HENNING u. WITTE (50). Atebrin wurde in Dosen von insgesamt 1 g über 2 - 3 Tage peroral verabreicht und so eine intravitale Fluorochromierung von Karzinomzellen im Magen- und Darm-Trakt herbeigeführt. Nach Entnahme mit der Tupfsonde ließen sich im unfixierten Nativpräparat die Karzinomzellen im Fluo-

reszenzmikroskop durch eine intensive gelbe cytoplasmatische Fluoreszenz von den normalen Zellen des Verdauungstrakts leicht unterscheiden und es konnte eine Verdachtsdiagnose gestellt werden, die zusammen mit den übrigen klinischen Befunden evtl. eine endgültige Diagnose erlaubte (HENNING u. WITTE (50), WITTE (102)).

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an der Haut nehmen im Vergleich zu den übrigen Anwendungsgebieten der Fluoreszenzmikroskopie einen verhältnismäßig kleinen Raum ein, ebenso wie cytologische Untersuchungen mit anderen Färbemethoden, offensichtlich weil die leichte Zugänglichkeit fast in jedem Fall eine histologische Untersuchung ermöglicht. Aber schon im Jahre 1911 wurden von STÜBEL und BOMMER Untersuchungen über Eigenfluoreszenz der Haut vorgenommen und zwar im UV-Licht, die später von HAITINGER (36), HAMPERL (38, 39) und FLEGEL (26, 27) weiter ausgebaut wurden. Es handelte sich zunächst meist um ungefärbte, unfixierte und fixierte Hautschnitte oder Betrachtung der Haut im Auflichtmikroskop mit UV- oder Blaulicht. Die Untersuchungsmethoden der Haut mithilfe der Eigenfluoreszenz erwiesen sich jedoch als unzureichend, sodaß Fluorochrome zur Erzeugung von Sekundärfluoreszenz herangezogen wurden. Umfangreichere Arbeiten über Fluorochromierung der normalen und pathologisch veränderten Haut stammen von HAMPERL und FLEGEL, von denen vorallem letzterer das Acridingelb und Acridinorange zur Erzeugung von Sekundärfluoreszenz heranzog, weil sich damit ohne großen Zeitaufwand sehr brilliante, plastische Fluoreszenzbilder von Gefrierschnitten und fixierten Schnitten erzielen ließen und sich gerade bei dieser Färbung Mitosen, Nukleolen, Mastzellen, Leuko- und Lymphocyten sowie kollagene und elastische Fasern durch starke Farbkontraste rasch differenzieren ließen.

Mit dem allgemeinen Aufschwung der Cytologie mehrten sich auch die diagnostischen Versuche an der normalen und pathologisch veränderten Haut (STREICHER-SANDKÜHLER (89), HAUSER (48), GLADSTONE (30), WINER u. LIPSCHULZ (100), TZANK (94), KNOTH (54)). Die fluoreszenzmikroskopische Cytodiagnostik der Haut hat jedoch, abgesehen von einzelnen französi-

schen und amerikanischen Versuchen neuerer Zeit, noch keine besondere Bedeutung gewonnen (TZANK (94), RASKIN (69)). Verwendung fand dagegen die Fluoreszenzmikroskopie in Deutschland bei Untersuchungen über die Eindringtiefe und Haftfähigkeit von epikutan angewandten Stoffen, insbesondere Teeren (KNOTH, HERMANN u. MEYERHÖFER (55)), sowie in der Fluoreszenzauflichtmikroskopie zur Schnelldiagnostik von Operationspräparaten (WALZ (97)).

Eigene Untersuchungen

Mit unseren im folgenden beschriebenen Untersuchungen beabsichtigten wir, mit verschiedenen Methoden der Fluorochromierung den Wert der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der fluoreszenzmikroskopischen Cytodiagnostik, in der Diagnostik von Hautkarzinomen genauer zu bestimmen, da die relative Einfachheit der Methodik und die leichte, stets wiederholbare Materialentnahme ohne wesentliche Beeinträchtigung des Patienten zweifellos gegenüber der bisherigen, konservativen histologischen Methodik zunächst Vorteile zu bieten scheint. Im wesentlichen sollten Methoden, die in anderen medizinischen Fachrichtungen sich teilweise schon einen festen Platz in der Diagnostik erworben haben auf das Gebiet der Diagnostik von Hautkarzinomen übertragen und ihre Brauchbarkeit und ihre Vor- und Nachteile gegenüber den bisherigen Methoden überprüft werden.

Bei Patienten, bei denen klinisch der Verdacht auf ein Hautkarzinom gegeben war, - gleichgültig ob Basal- oder Spinalzellenkarzinom im Sinne von KROMPECHER (GANS (29), ZIERZ (107)) -, wurden nach Möglichkeit folgende Untersuchungen vorgenommen:

I.) Cytologisches Präparat, nativ, nach intravitaler Fluorochromierung mit Atebrin

II.) Cytologisches Präparat, fixiert, fluorochromiert mit Acridinorange

III.) Cytologisches Präparat, fixiert und gefärbt nach Pappenheim (als Kontrollmethode)

IV.) Histologischer Schnitt, fluorochromiert mit Acridinorange

Unabhängig hiervon wurde im Rahmen der bisher gebräuchlichen Diagnostik ein histologischer Schnitt nach der üblichen Methodik (Formalinfixierung, Paraffineinbettung, Haemalaun-Eosin-Färbung (47, 71)) angefertigt. Dieser wurde zum Vergleich der Treffsicherheit der obigen Methoden herangezogen.

Da bei den histologischen Schnitten auch Präparate von nicht stationären Patienten zur Verfügung standen, wurden nach Methode IV 75 Fälle untersucht, wogegen nach Methode II und III nur 50 stationäre Fälle und nach Methode I nur 45 untersucht werden konnten. Selbstverständlich wurden in jedem Fall jeweils mehrere Präparate angefertigt, sodaß die Anzahl der untersuchten cytologischen oder histologischen Präparate ein vielfaches der angegebenen Zahlen beträgt.

Vorausgegangen waren umfangreiche Untersuchungen an normaler oder lediglich entzündlich veränderter, aber sicher nicht karzinomatöser Haut, um die einzelnen Methoden zu erproben und die für uns geeignetsten herauszufinden. Sie dienten gleichzeitig dazu, mit der Morphologie der Haut und ihrem Zellgehalt in den durch die einzelnen Methoden bedingten verschiedenen Erscheinungsformen vertraut zu werden und einen Vergleichsmaßstab zu gewinnen. Anschließend wurden die verschiedenen Methoden an histologisch gesicherten Hautkarzinomen angewendet, um die optimalen Versuchsbedingungen für die geplanten Untersuchungen herauszufinden. Sofern die Ergebnisse aus den Voruntersuchungen von Bedeutung sind, werden sie bei den entsprechenden Abschnitten mit abgehandelt.

H i l f s m i t t e l und M e t h o d i k

Mikroskop und Hilfsapparate:

Die mikroskopischen Arbeiten erfolgten mit dem "Leitz-Panphot". Es standen dabei zur Verfügung je eine optische Einrichtung für Hellfeld, Phasenkontrast und Fluoreszenz.

Bei den Beobachtungen im Hellfeld wurden die Okulare Periplan GT 10x und Objektive C Pl 4/0.10, C Pl 10/0.25, Pl 40/0.65, C Pl Apo Oel 100/1.32 und der Hellfeldkondensor verwendet. Als Beleuchtungsquelle diente eine Niedervoltlampe Osram 12 V 60 W. Diese optische Einrichtung fand Verwendung bei den panoptisch gefärbten Präparaten (Methode III).

Die Phasenkontrastoptik, bestehend aus der gleichen Beleuchtungsquelle, den Okularen Periplan GT 10x und den Phasenkontrastobjektiven Pv 10/0.25, Pv 20/0.45, Pv Apo L 40/0.70 und Pv Apo Oel 90/1.15 sowie einem Phasenkontrastkondensor nach H e i n e, wurde bei der Beobachtung atebrinfluorochromierter Präparate verwendet (Methode I).

Für die Fluoreszenzbeobachtungen stand die Fluoreszenzeinrichtung von Leitz, Wetzlar, zur Verfügung, im wesentlichen bestehend aus einer Quecksilber-Höchstdrucklampe, die als Lichtquelle den Quecksilber-Höchstdruckbrenner Philips CS 150W enthält und eine hohe Strahlendichte im Bereich zwischen 300 und 400 mu besitzt, sowie aus folgender Filterkombination: Blaufilter 4 mm BG 12 (390 - 440 mu), UV-Filter 2 mm UG 1 (366 mu), Streuscheibe N, UV-Filter 2 mm UG 1, Graufilter 0,2%, Graufilter 5 %. Im Kollektor fest eingebaut ist ein Wärmeschutzfilter 2 mm KG 1. Als Ersatz für ein Flüssigkeitsfilter zur Rotabsorption diente das Filter BG 38. Dazu wurden für die Blaulichtfluoreszenz das Sperrfilter "Blau-abs." und für die UV-Fluoreszenz das Sperrfilter "UV-abs." verwendet. Der hohe Blau- und UV-Anteil des Lampenspektrums erzeugt eine relativ starke Fluoreszenz, sodaß nicht in einem völlig abgedunkelten Raum gearbeitet werden muß, obwohl weitgehende Abdunkelung

und Adaptation von Vorteil ist.

Bei den Fluoreszenzuntersuchungen wurde bei Methode II und IV die normale Hellfeldoptik verwendet, keine speziellen Fluoreszenzobjektive, selbstverständlich mit den entsprechenden vorgeschalteten Sperrfiltern. Für Methode I, die Beobachtung atebrinfluorochromierter Nativpräparate wurde die Phasenkontrasteinrichtung mit dem Heine-Kondensor in Dunkelfeldstellung benützt, da so die fluoreszierenden Zellen durch Verschieben des Kondensorspiegelkörpers sofort im Phasenkontrastbild beobachtet und beurteilt werden konnten. Da die Phasenkontrastmikroskopie eine cytologische Tumordiagnose erlaubt (v. ALBERTINI (1), RUNGE, VÖGE u. HASELMANN (74), LÜDIN (61), WITTEKIND (104), KOSENOW (56)), war so eine zusätzliche Kontrollmöglichkeit gegeben. Die Fluoreszenz ist mit der Phasenkontrastoptik ebenso gut zu beobachten, lediglich die Strahlenintensität ist dabei etwas geringer.

Spezielle Objektträger oder Deckgläser für die Fluoreszenzmikroskopie wurden nicht verwendet.

Grundsätzlich wurde bei cytologischen Fluoreszenzpräparaten die Blaulicht-Fluoreszenz angewandt, da hier die Intensität der Fluoreszenzstrahlung wesentlich stärker und bei Nativpräparaten die Schädigung durch das Erregerlicht geringer ist als bei Strahlen im kurzwelligen UV-Bereich. Lediglich bei sehr hellen und farbkräftigen Präparaten, wie das manchmal bei histologischen Schnitten der Fall ist, wurde häufig die UV-Fluoreszenz benützt, da dann die Überstrahlungen geringer und deshalb die strukturellen Einzelheiten oft etwas besser zu erkennen waren. Die Fluoreszenzfarben sind in ihrer Qualität bei Blaulicht- und UV-Fluoreszenz im wesentlichen gleich, sodaß bei unseren Untersuchungen beide Beobachtungsmöglichkeiten, u.U. auch im Wechsel, zur Beurteilung herangezogen werden konnten.

Für die photographischen Wiedergaben wurden die gleichen optischen Einrichtungen verwendet zusammen mit einer Leica. Außer schwachen bis mittleren Graufiltern wurden weder bei Hellfeld- noch bei Fluoreszenzaufnahmen besondere Farbfilter

verwendet. Bei Schwarz-Weiß-Aufnahmen benützten wir einen Adox KB 14° DIN 24x36 mm Kleinbildfilm. Für gefärbte Präparate im Hellfeld lagen bei einer Beleuchtung mit 6 Ampère für cytologische Präparate je nach Präparatdichte die Belichtungszeiten mit mittlerem Graufilter um 1/10 - 1/2 sec, für cytologische und histologische Fluoreszenzpräparate zwischen 1 - 4 Minuten.

Zu Farbaufnahmen verwendeten wir den Agfa-Umkehrfilm CK 20° DIN 24x36 mm. Hier lagen die Belichtungszeiten von gefärbten cytologischen Präparaten im Hellfeld zwischen 1/5 und 1/20 sec bei mittlerem Graufilter, von cytologischen Fluoreszenzpräparaten je nach Intensität der Fluoreszenz zwischen 20 und 5 sec. Die fluorochromierten histologischen Schnitte benötigten Belichtungszeiten zwischen 1/2 und 5 sec je nach Helligkeit der Präparate.

Die optimalen Belichtungszeiten wurden durch Testreihen ermittelt. Von der Verwendung einer Belichtungsautomatik, die angeblich auch bei Fluoreszenzaufnahmen gute Ergebnisse erzielt, wurde Abstand genommen.

Allgemein kann die fluoreszenzmikroskopische Mikrophotographie sich sehr schwierig gestalten, da die Belichtungszeiten wegen der oft stark wechselnden Fluoreszenzintensität relativ stark schwanken können. Leider müssen wir uns aus technischen Gründen auf die Wiedergabe von lediglich einigen Photos beschränken, die Reproduktionen von Farbdiapositiven darstellen und somit nur eine ungefähre Vorstellung von der Farbfreudigkeit und Brillianz der Präparate zu geben vermögen.

Methodik der Materialgewinnung:

Die Materialgewinnung für die histologischen Präparate erfolgte in der üblichen Weise durch die Probeexcision bzw. durch eine Stückexcision eines in toto entfernten Tumors.

Da in den meisten Fällen eine Probeexcision vorgenommen wurde, wurde auch bei den cytologischen Untersuchungen davon Gebrauch gemacht und von den Excisionsstücken Tupfpräparate

hergestellt, indem eine frische Schnittfläche des Excisionsstückes senkrecht mit leichtem Druck auf den Objektträger aufgesetzt wurde (STREICHER-SANDKÜHLER (89), UNDRITZ (96)).

Gleichzeitig wurde aber stets versucht, vor der Excision vom Herd selbst abzunehmen, wobei sich bei exulcerierten Herden die Abstrichmethode oder das Abtupfpräparat mit einem in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Wattestäbchen (BRUNTSCH (14), KRAUSHAAR (58)) für unsere Zwecke am besten bewährte. Bei hyperkeratotischen Herden war ein Abschabpräparat mit Spatel oder Objektträgerkante (AYRE (5), WITT (101)) notwendig oder evtl. die Punktion (SANDKÜHLER (89), UNDRITZ (96)). Bei kleineren Herden kam aber in den meisten Fällen eine Excision in toto in Frage, sodaß hier die einfachste Methode, bei entsprechender Übung, das Tupfpräparat von der Excision darstellte. Diese letztere Methode ergab auch in höchstem Maße gut erhaltene Zellen, wogegen bei Abstrichen mit dem Wattetupfer bei den relativ "trockenen" Hautherden die Gefahr der Zellzertrümmerung größer war.

Färbemethoden und Farbstoffe:

Die bei den Vorversuchen zunächst angewandte Papanicolaou-Färbung mit den Merck'schen Farblösungen nach Papanicolaou: Haematoxylinlösung nach Harris, Orange-G-Lösung OG 6 und Polychromlösung EA 50 zeigte gegenüber den panoptisch gefärbten Präparaten keine wesentlichen Vorzüge. Besonders die in schleimhaltigen und sehr zellreichen Abstrichen notwendige starke Differenzierung bei der Papanicolaoufärbung war bei unseren fast rein zellhaltigen Präparaten nicht notwendig, sodaß die panoptische Färbung nach Pappenheim in Übereinstimmung mit STREICHER-SANDKÜHLER (89), RIEGEL (70), KNOTH, HERMANN u. MEYERHÖFER (55) u.a. hier mindestens gleich gute Befunde ergab, ja durch die weniger starke Schrumpfung u.U. sogar eine bessere Feinstrukturbeurteilung ermöglichte. Außerdem ist der Arbeitsgang bei der panoptischen Färbung wesentlich einfacher und der Zeitaufwand geringer.

Die panoptische Färbung nach Pappenheim, die eine Kombination der May-Grünwald- und Giemsa-Färbung darstellt, wurde in Anlehnung an HENNING (49) nach folgendem Schema vorgenommen und nur gelegentlich entsprechend der Ausstrichdicke leicht modifiziert. Verwendet wurden hierfür die Merck'schen Reagenzien "Azur-Eosin-Methylenblaulösung nach Giemsa" und "Eosin-Methylenblaulösung für die May-Grünwald-Färbung".

Färbevorgang:

1. Lufttrocknung des Präparats
2. May-Grünwald-Lösung 3 min
3. Gleiche Mengen neutrales Wasser dazugeben, 5 min
4. Frische Giemsalösung (15 gtt. auf 20 ccm Aq.dest.)30-50 min
5. Mehrmals Abspülen mit neutralem Wasser
6. Trocknung und Reinigung des Präparats

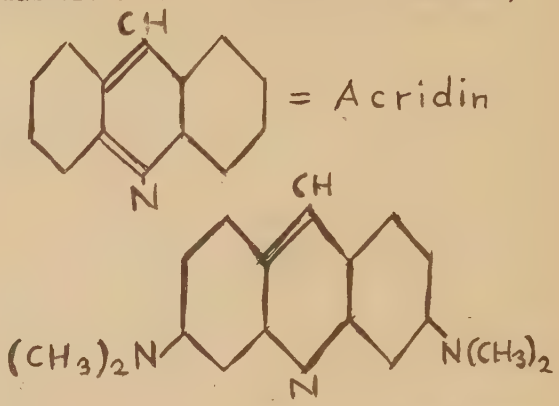
Es konnten damit optimal gefärbte cytologische Präparate erzielt werden.

Da, wie oben erwähnt, für mikroskopische Untersuchungen an Geweben und Zellen die Eigenfluoreszenz meist nicht ausreicht, um wesentliche diagnostische Schlüsse daraus zu ziehen, ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, den sog. Fluorochromen nötig. Nach STRUGGER sind Fluorochrome "Körper, die in gelöstem Zustand befähigt sind, einem nicht fluoreszierenden Körper durch chemisch-physikalische Bindung an denselben die Fähigkeit der Fluoreszenz zu erteilen". Es handelt sich dann um eine sogenannte Sekundärfluoreszenz.

Für unsere fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wählten wir als Fluorochrome Atebrin und Acridinorange, einerseits angeregt durch die an der hiesigen medizinischen Klinik erfolgten cytologischen Untersuchungen an Karzinomen des Verdauungstrakts nach intravitaler Atebrinfluorochromierung (WITTE (102), HENNING u. WITTE (50)) und andererseits durch die von zahlreichen Untersuchern hervorgehobene hervorragende Eignung des Acridinorange als Fluorochrom (STRUGGER (90), BUKATSCH u. HAITINGER (15, 37), SCHÜMMELFEDER (84, 79), FLEGEL (26, 27), DART u. TURNER (21), L.v.BERTALANFFY (13, 9),

F.D. BERTALANFFY (11, 6) u.a.).

In beiden Fällen handelt es sich um Acridinfarbstoffe, die sowohl als Diachrome als auch als Fluorochrome anzusprechen sind. Werden beim Acridin mit nebenstehender Formel je ein H-Rest in der 3- und 6 - Stellung durch $N(CH_3)_2$-Gruppen ersetzt, so erhält man das Acridinorange oder 3,6 - Tetramethyldiamino-acridin mit obiger Formel.



Als Diachrom ist Acridinorange bei Verdünnungen bis zu 1 : 100 000 hellgelb und wird mit zunehmender Konzentration kreßfarben.

Als Fluorochrom stellt es einen Vertreter der Gruppe der basischen oder kathodischen Fluorochrome dar, der im sauren Bereich bis pH 6 völlig dissoziiert, im äußersten alkalischen Bereich völlig undissoziiert ist. Die dissoziierten Kationen sind Träger der Fluoreszenz, sie werden elektroadsorptiv an freie Valenzen der Eiweiße gebunden. Diese Kationen zeigen eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzmetachromasie ("Konzentrationseffekt" nach STRUGGER (90)): Farblösungen zwischen 1 : 100 000 und 1 : 10 000 fluoreszieren grün, um 1 : 5 000 gelbgrün, um 1: 1000 gelb, um 1 : 500 kreß und um 1 : 100 rot. Letzteres ist nach ZANKER Ausdruck der Bildung von rotfluoreszierenden Polymeren des Kations, die Zwischenfarben Gelb und Orange sollen einer Mischung von Monomeren und Polymeren entsprechen. Aber auch die physikalisch-chemische Zusammensetzung bestimmter Gewebsbestandteile hat unabhängig von der Farbkonzentration einen Einfluß auf die Menge der elektroadsorptiv gebundenen Kationen und somit auf die Färbung. Die Ampholytnatur der Eiweiße mit ihren jeweils verschiedenen sauren und basischen Gruppen ist dabei ausschlaggebend.

Nach UNNA (zitiert bei FLEGEL (26, 27)) erklären sich z. B. an der Haut die Farbunterschiede durch die verschiedene Anfärbung der Sauerstoff- und Reduktionsorte. Das basophile Säureeiweiß der Sauerstofforte fluoresziert rot, das azidophile basische Eiweiß der Reduktionsorte blaugrün. Diese Theorie wird im wesentlichen durch Angaben von FLEGEL bestätigt. Außerdem ist die Fluoreszenzfarbe abhängig vom pH-Wert der Farblösung: Unterhalb von pH 8,4 zeigt sich schwach grüne, oberhalb stark gelbgrüne Fluoreszenz, weshalb Acridinorange auch als einfarbiger Fluoreszenzindikator Verwendung findet. Als letztes besteht noch eine Abhängigkeit von der Färbedauer. Kurz gesagt ist also die Farbstoffmenge, die von einer bestimmten Struktur aufgenommen wird, proportional der Farbstoffkonzentration , dem pH-Wert der Farblösung und der Färbedauer, wobei bei zunehmender Farbstoffaufnahme eine zunehmende Farbänderung von grün über gelb und orange zu rot eintritt. Deshalb ist die Einhaltung von konstanten Versuchsbedingungen unbedingt notwendig.

Lebendes Protoplasma, zu dem Acridinorange eine ausgeprägte Affinität besitzt und so eine rasche und schonende Vitalfärbung ermöglicht, fluoresziert nur grün, totes Plasma nur rot. Diese Erscheinung erklärt sich aus den obengenannten Bedingungen, insbesondere aus dem Konzentrationseffekt, da beim Absterben der Eiweiße saure und basische Valenzen frei werden und die Kationen des Acridinorange in größerer Anzahl elektroadsorptiv gebunden werden und so zu Rotfluoreszenz führen. In der Vitalfärbung ermöglicht also Acridinorange eine Unterscheidung von lebendem und totem Gewebe (STRUGGER (90), HAITINGER (37), FLEGEL (26) u.a.).

Von GÖSSNER (31), ZEIGER (105), HAMPERL u. SCHÜMMELFEDER (54, 79, 80), BERTALANFFY (8,12) und ihren Mitarbeitern wurde die ausgesprochene Affinität von Acridinorange zur RNS und DNS bewiesen. Da Acridinorange ein basisches Fluorochrom ist, werden vorallem die sauren Gewebsbestandteile wie Mukopolysaccharide, Nukleinsäuren und Mastzellen angefärbt. Weshalb jedoch die RNS des Cytoplasmas rot fluo-

reszierte, die DNS des Kernchromatins dagegen gelbgrün, wie allgemein beschrieben wurde (SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (84, 83), DART u.TURNER (21), BERTALANFFY u. Mitarb. (13, 12, 9, 11, 6, 7), ELEVITCH u. BRUNSON (24) u.a.), war zunächst nicht erklärbar. Die Untersuchungen SCHÜMMELFEDER's und seiner Mitarbeiter haben jedoch gezeigt, daß die verschiedenen Fluoreszenzfarben der beiden Nukleinsäuren auf dem unterschiedlichen Polymerisationsgrad derselben beruhen. Depolimerisierte man die höher polymerisierte DNS des Zellkerns mithilfe von Desoxyribonuklease oder Säuren, so trat anstelle der ursprünglich vorhandenen Gelbgrünfluoreszenz eine starke Rotfluoreszenz. Wurde RNS durch Fermente oder Säurebehandlung entfernt, fehlte jegliche Rotfluoreszenz.

In unseren Voruntersuchungen haben wir Färbungen mit Acridinorange unter verschiedenen Bedingungen bezüglich Zeit, Konzentration und pH - Wert vorgenommen. In Übereinstimmung mit ARMSTRONG (3), BERTALANFFY u. BICKIS (12) und SCHÜMMELFEDER (78) liegt der günstigste pH- Bereich zwischen 3 und 7, da hier die spezifische Affinität von Acridinorange zu der RNS und DNS wirksam wird. Bei niedrigeren pH - Werten ist die Bindung zu gering, bei höheren kommt es auch zu einer intensiven Anfärbung der meisten anderen Gewebebestandteile. Um gleiche Versuchsbedingungen einzuhalten und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, haben wir uns in den Hauptuntersuchungen jeweils auf eine, uns in der Fluoreszenz optimal und in der Methodik relativ einfach erscheinende Färbemethode beschränkt.

Verwendet wurde Acridinorange "Bayer", Charge Nr. 521212. Für die Acridinorangefluorochromierung histologischer Scgnitte benützten wir in Anlehnung an die Angaben von HAITINGER (36), HAMPERL (43) und FLEGEL (26,27) formalinfixiertes Material, das in der üblichen Weise nach Unterbrechung der Fixierung und Entwässerung in der Alkoholreihe über das Zwischenmedium Toluol in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten wurde. Die Gefrier -

schnittmethode, die kürzere Verarbeitungszeiten erlaubt, wurde nicht angewendet, da die feineren Paraffinschnitte aufgrund der geringeren Schichtdicke bessere Beobachtung von Struktureinzelheiten ermöglichten.

Die Paraffinschnitte wurden folgendermaßen verarbeitet:

1. Entparaffinieren : Xylol mindestens 5 - 6 min
   Absteigende Alkoholreihe mindestens je 2 - 5 min
2. Wässern in Aqua dest. 5 min
3. Acridinorangefärbung: Wässerige Lösung von Acridinorange 1 : 10 000 für 5 min
4. Auswaschen in Aqua dest. 5 min
5. Kurze Formalinfixierung (zwischen 5 und 30 min)
6. Eindecken in Paraffinöl und Umranden mit Canadabalsam

Da Paraffinöl keine nennenswerte Eigenfluoreszenz besitzt, eignet es sich gut als Eindeckungsmedium, Canadabalsam dagegen zeigt starke Eigenfluoreszenz und kann nicht verwendet werden (HAITINGER (37), FLEGEL (26, 27), HAMPERL (43). Zur Umrandung ist er aber durchaus verwendbar, obwohl im Laufe von Monaten der Canadabalsam in das Eindeckungsmedium eindiffundiert und somit das Präparat unbrauchbar wird. Allerdings ist in dieser Zeit auch trotz nochmaliger Formalinfixierung der Farbstoff ebenfalls schon weitgehend in das flüssige Eindeckungsmedium diffundiert, sodaß die anfänglich außerordentlich farbenprächtigen und brillianten Schnitte nach etwa 1/2 Jahr unbrauchbar werden. Leider ist uns zur Zeit noch kein Eindeckungs- oder Umrandungsmedium bekannt, mit dem sich wirklich dauerhafte Präparate erzielen lassen. Versuche mit Kunststoffen könnten hier eventuell eine Änderung schaffen.

Von der Verwendung von ungepufferten Farb- oder Auswaschbädern sahen wir bei den verwendeten Paraffinschnitten keine Nachteile.

Bei der Acridinorangefluorochromierung cytologischer Präparate haben wir uns von der von L. v. u. F.D. BERTA-

LANFFY (7) angegebenen Methodik bedient. Sie liefert stark fluoreszierende Ausstriche und ermöglicht eine gute Beurteilung:

1. Fixierung der noch leicht feuchten Abstriche oder Tupfpräparate in einer Fixierflüssigkeit bestehend aus Aethylalkohol 96 % und Aethylaether im Verhältnis 1 : 1. Die Fixierungsdauer sollte mindestens 1 Stunde, kann aber unbeschadet auch mehrere Stunden betragen. Soll eine Sofortdiagnose gestellt werden, so werden die Präparate ohne längere Fixierung sofort übertragen in

2. Absteigende Alkoholreihe (80 %ig, 70 %ig, 50 %ig) mindestens insgesamt 1/2 min.
   Hydrierung in Aqua dest.
   1 %ige Essigsäure(gegen Ausbleichen) insgesamt 1 min
   Kurzes Spülen in Aqua dest.

3. Färbung in einer 0,01 %igen Acridinorangepufferlösung von pH 6

4. Übertragung in Phosphatpuffer (pH 6) mindestens 1 min , unbeschadet stundenlang

5. Differenzierung in 0,1 M $CaCl_2$-Lösung mindestens 1 - 2 min evtl. länger. Als Bezugsmaßstab dienen die Leukocyten, die klar leuchtend grün fluoreszieren sollen.

6. Spülung in Phosphatpufferlösung zur Beendigung der Differenzierung

7. Den noch feuchten Ausstrich mit Deckglas bedecken und im Fluoreszenzmikroskop betrachten

Nach Durchsicht der Präparate ist Entfärbung in 50 %igem Alkohol möglich, sodaß die Ausstriche entweder für andere Färbungen oder für erneute Fluoreszenzbetrachtung verwendet werden können.

Die verwendete Pufferlösung wurde nach BERTALANFFY aus 1/15 M KH_2PO_4 und 1/15 M Na_2HPO_4 hergestellt. Dazu werden 9,072 g KH_2PO_4 in 1000ml Aqua dest. und 9,465 g Na_2HPO_4

in 1000 ml Aqua dest gelöst. Zur Herstellung des Puffers werden 230 ml KH_2PO_4- Lösung und 40 ml Na_2HPO_4- Lösung gemischt.

Die verwendete 0,1 M $CaCl_2$-Lösung erhält man durch Auflösen von 11,099 g $CaCl_2$ in 1000 ml Aqua dest.

Mit dieser Methodik ist es möglich innerhalb von etwa 10 Minuten eine Diagnose zu stellen. Es können aber, falls aus technischen Gründen eine sofortige Verarbeitung nicht möglich oder nötig ist, ohne Schaden die Präparate in der Fixier- oder Pufferlösung verbleiben und erst nach Stunden beurteilt werden.

Für die intravitale Fluorochromierung (Methode I) verwendeten wir nach Angaben von HENNING u. WITTE (50, 102) Atebrin "Bayer".

Atebrin ist ebenfalls ein Acridinderivat, wobei im Atebrinmolekül das H-Atom in Stellung 3 durch Cl, in Stellung 7 durch CH_3O und in Stellung 9 durch den Rest

$$NHCH(CH_3)\cdot CH_2CH_2CH_2\cdot N(C_2H_5)_2$$

ersetzt ist.

Auch hier handelt es sich um einen Farbstoff, der sowohl ein Diachrom von intensiv goldgelber Farbe, als auch ein kathodisches Fluorochrom darstellt. Die Eigenschaften als Fluorochrom sind bei Atebrin nicht so vielseitig und eingehend erforscht wie bei Acridinorange, jedoch entsprechen sie im wesentlichen den grundsätzlichen Eigenschaften der anderen Acridinfarbstoffe. Bei Fluorochromierung lebender Zellen und Gewebe mit Atebrin wird ebenfalls eine grüne bis gelbliche Fluoreszenz erzeugt.

Wir verwendeten Atebrin abgesehen von verschiedenen Voruntersuchungen lediglich als Vitalfarbstoff, um die Möglichkeit der intravitalen Fluorochromierung von Hautkarzinomen zu untersuchen. Dabei wurde 1 g Atebrin "Bayer" über einen Zeitraum von 2 Tagen verteilt peroral verabreicht, d.h. 5 Tabletten zu je 0,1 g pro Tag.

Bei Patienten mit schlechter Magenverträglichkeit oder

bei "schlechten Tablettenschluckern" verabreichten wir an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,3 g Atebrin pro injektione intramuskulär.

Diese Dosis entspricht etwa der früher bei der Malariabekämpfung üblichen, allerdings dort über 5 - 10 Tage verteilten Dosis. Abgesehen von gelegentlichem leichten Meteorismus wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Deutliche Gelbfärbung der Hautoberfläche oder der Skleren trat nicht auf.

Am 3. Tag wurden entweder vom Herd selbst Abstrichpräparate oder von der Probe- bzw. Totalexcision Tupfpräparate angefertigt, eine Hälfte davon auf Deckgläschen, die andere auf normalen Objektträgern. Die Deckgläschen wurden mit 1 - 2 Tropfen physiologischer Kochsalz- oder Ringerlösung versehen (ROULET (72)), auf einen sauberen Objektträger gelegt und mit Vaseline umrandet, um in der entstehenden Flüssigkeitskammer die Lebensfähigkeit der Nativpräparate möglichst lange zu erhalten. Dann wurde sofort mittels des Fluoreszenzmikroskops die Untersuchung und Auswertung vorgenommen.

Die zweite Gruppe der Präparate, nämlich die auf den Objektträgern vorgenommenen Tupf- oder Abstrichpräparate, wurden in Alkohol-Äther-Gemisch 1:1 fixiert und ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Grundlagen der Beurteilung:

Bei der Untersuchung der cytologischen Präparate wurden die allgemein als morphologische Besonderheiten, jedoch nicht als krebsspezifisch anerkannten Kennzeichen der Krebszelle zur Beurteilung herangezogen: Meta- und Hyperchromasie, Kern- und Zellpolymorphie, Mitosenreichtum und Mitoseatypien, Verschiebung der Kern-Plasma- und Kern-Kernkörperchen-Relation, Vergrößerung und Vermehrung der Nukleolen und atypische Färbung derselben, Verstärkung der Kernmembran etc. (HAMPERL (40), GANS (29), STREICHER-SANDKÜHLER (89), SWANSON (93), CARDOZO (17), HAUSER (48), SCHÜMMELFEDER (82), KNOTH (54), WITT (101), MOHR (66), PAPANICOLAOU (68) u.a.).

Dabei wurde stets berücksichtigt, daß auch bei degenerativen und entzündlich reparativen Prozessen nichtmaligne Einzelzellen mit "Krebsmerkmalen" vorkommen können, wie besonders FERGUSON (25) in einer zusammenfassenden Arbeit hervorgehoben hat. Andererseits kann die Diagnose auch nicht aufgrund einer einzelnen, sicher als pathologisch anzusprechenden Zelle gestellt werden, es müssen stets eine mehr oder minder große Anzahl deutlich veränderter Zellen vorhanden sein, um eine cytologische Diagnose zu ermöglichen (HARTMANN (46), MEESEN (62), KAHLAU (52)).

Die Beurteilung eines Ausstriches erfolgte in Anlehnung an STREICHER systematisch nach folgendem Schema:

I. Blutgehalt
II. Nichtzellige Beimengungen
III. Allgemeiner Zellgehalt
IV. Lagerung der Zellen
V. Überwiegend vorkommende Zellart = "Hauptzellart"
    1. Zellgröße, Form und Begrenzung
    2. Färbungsintensität
    3. Kern-Plasma-Relation (KPR)
    4. Kern-Zahl, -Größe, -Form, -Farbe
    5. Kernwandbeschaffenheit
    6. Kernstruktur
    7. Kernkörperchen (Anzahl,Größe,Form,Farbe,Kontrast)
    8. Kern-Kernkörperchen-Relation (KKR)
    9. Cytoplasma: Farbe, Farbintensität, Begrenzung
    10. Cytoplasmastruktur
    11. Regelmäßigkeit der Verteilung obiger Eigenarten
    12. Cytoplasmaeinschlüsse
    13. Mitosen
VI. Besondere Zellen im Rahmen der Hauptzellart
VII. Andere vorkommende Zellarten
VIII. Sonstige Bemerkungen

Falls Bestimmungen der Kern-Plasma-Relation und Kern-Kernkörperchen-Relation nötig waren, haben wir uns nicht der KARP'schen Methode des Flächenvergleichs, sondern der zwar weniger exakten, aber einfacheren und für unsere Zwecke aus-

reichenden Methode von QUENSEL, dem Vergleich der jeweiligen Durchmesser, bedient.

Nach den obigen Kriterien wurden die einzelnen Präparate bei der panoptischen Färbung, im Phasenkontrastbild und bei der morphologischen Betrachtung der Fluoreszenzpräparate beurteilt. Hierzu verwendeten wir als Grundlage das von PAPANICOLAOU (68) angegebene 5-Gruppen-Schema, nach dem die cytologischen Präparate bei der Diagnosestellung in 5 Gruppen aufgeteilt werden:

Gruppe I: Cytologisch normales Spektrum der zellulären Elemente. Kein begründeter Karzinomverdacht.

Gruppe II: In einem normalen Zellspektrum vereinzelt Zellelemente, die sich nicht sicher einordnen lassen. Gesamteindruck: Wahrscheinlich kein Karzinom.

Gruppe III: Sporadisch atypische Elemente mit Verdacht auf Malignität. Gesamteindruck: Wahrscheinlich Karzinom.

Gruppe IV: Reichlich atypische Zellen. Sehr wahrscheinlich Karzinom.

Gruppe V: Zahlreiche oder ausschließlich atypische Zellen, die als sicher maligne anzusprechen sind. Eindeutig Karzinom mit Sicherheit eines histologischen Schnittes.

Nur cytologische Präparate der Gruppe IV und V wurden als "positiv" bezeichnet, Präparate der Gruppe I entsprechend als "negativ". Bei den Gruppen II bzw. III wurde die Diagnose "wahrscheinlich negativ" bzw. "wahrscheinlich positiv" gestellt.

Bei den Fluoreszenzpräparaten wurden neben dem morphologischen Bild auch die färberischen Kennzeichen berücksichtigt, d.h. die auf verschiedenem physiko-chemischen Verhalten der Zellbestandteile gegenüber dem Fluorochrom beruhenden Fluoreszenzfarben. Es bietet sich somit bei der Fluorochromierung die Möglichkeit, nicht nur morphologische, sondern auch cytoplasmatische Merkmale der Zelle zu beurteilen (CHONÉ (19)).

Bei den atebrinfluorochromierten Präparaten sollte die zu erwartende Grün- und Gelbfluoreszenz nach Intensität und Farbe begutachtet werden, bei den mit Acridinorange fluorochromierten cytologischen Präparaten die stets vorhandenen Grün- und Gelbgrünfluoreszenzen der Kerne und des Cytoplasmas mancher Zellen, sowie evtl. vorhandene Orange- bis Rotfluoreszenzen.

Bei den histologischen fluorochromierten Präparaten kam ebenfalls die zusätzliche Beurteilung nach der Fluoreszenzfarbe zu den allgemein üblichen histopathologischen diagnostischen Kriterien hinzu, - hier neben den obengenannten Kennzeichen der Einzelzelle vorallem das infiltrative und destruierende Wachstum und die Beziehungen zum Stroma.

Untersuchungsmaterial (Fälle)

Die Art und Anzahl der untersuchten Fälle, sowie die bei den einzelnen Patienten durchgeführten Untersuchungen sind aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich. Es handelt sich dabei nicht um ausgesuchte Fälle. In fortlaufender Folge wurden alle zum Zeitpunkt der Untersuchungen verfügbaren infrage kommenden Patienten, die sich zu den Untersuchungen bereitfanden, ohne jegliche Vorauswahl untersucht und die Diagnose gestellt, bevor jeweils der histologische Untersuchungsbefund aus der klinischen Untersuchung vorlag.

Grundsätzlich sollte bei allen Patienten, die sich zu den Untersuchungen bereitfanden, jede der vier obengenannten Methoden durchgeführt werden. Einige Fälle mußten jedoch aus technischen Gründen oder wegen bestehender Kontraindikationen (Leberschäden etc.) von der Atebrinfluorochromierung ausgenommen werden. Die histologischen Fälle vermehrten sich durch das an unsere Klinik eingesandte histologische Untersuchungsmaterial.

In der nun folgenden Liste der Fälle wurden bei den angegebenen Untersuchungsmethoden folgende Abkürzungen verwendet:

Atebrin = 1,0 g Atebrin peroral
Atebrin i.m. = 0,6 g Atebrin pro inj. intramuskulär
Acror.cyt. = cytologisches, mit Acridinorange fluorochromiertes Präparat
Acror.hist. = histologisches, mit Acridinorange fluorochromiertes Präparat
Panopt. = cytologisches, mittels panoptischer Färbung nach Pappenheim gefärbtes Präparat

1. P. Margarete, 55 Jahre

Klinische Diagnose: Verdacht auf linsengroßes Basaliom linker Nasenflügel
Vorgenommene Untersuchungen: Atebrin, Acror.cyt., Acror. hist., Panopt.
Histologische Diagnose: Beginnendes basozelluläres Karzinom

2. M. Kunigunde, 54 Jahre

Klin.Diag. : hirsekorngroßes Basaliom linke Wange
Vorg.Unters: Atebrin, Acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Beginnendes intraepitheliales Plattenepithelkarzinom

3. S. Maria, 81 Jahre

Klin.Diag. : 5-markstückgroßes, exulceriertes Plattenepithelkarzinom linke Stirnseite
Vorg.Unters: Atebrin, Acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Plattenepithel mit nur geringer Verhornungstendenz und massiver unspezifischer infiltrativ-proliferativer Entzündung

4. S. Christine, 67 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose linke Unterlippe
Vorg.Unters: Atebrin, acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag.: Umschriebene Hyper- und Parakeratose mäßigen Grades. Gesteigerte Sprossungstendenz des

deutlich zellatypischen Epithels. Es handelt sich offenbar um eine Praecancerose mit den Zeichen einer malignen Entartung

5. R. Fritz, 81 Jahre

Klin.Diag. : Erbsengroßes Keratoakanthopapillom rechte Wange
Vorg.Unters.: Atebrin, Acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Beginnendes Plattenepithelkarzinom

6. K. Andreas, 62 Jahre

Klin.Diag. : Pfennigstückgroßes exulceriertes Karzinomrezidiv rechter Augenwinkel
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Basalzellenkarzinom

7. R. Adolf, 64 Jahre

Klin.Diag. : 10-pfennigstückgroßes Basaliom rechte Wange
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Baso-spinozelluläres Karzinom mit massiver unspezifischer infiltrativer Entzündung

8. W. Hans, 68 Jahre

Klin.Diag. : Ulceriertes bohnenkerngroßes Peniskarzinom
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Unreifes Plattenepithelkarzinom mit massiver unspezifischer infiltrativ-proliferativer Entzündung

9. R. Josef, 77 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom linke Wange
Vorg.Unters.: Acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Beginnendes Plattenepithelkarzinom

10. S. Babette, 74 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom, exulceriert, linke Wange

Vorg.Unters.: Atebrin, Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Basalzellenkarzinom

11. Sch. Josef, 62 Jahre

Klin .Diag. : Handflächengroßes, exulceriertes Plattenepithelkarzinom linke Hand
Vorg.Unters.: Atebrin, Acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Plattenepithelkarzinom

12. Sch. Johann, 81 Jahre

Klin.Diag. : 10-pfennigstückgroßes exulceriertes Karzinom linkes Scheitelbein
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Panopt.
Hist.Diag. : Kein Ergebnis. Primär bestrahlt

13. F. Käthe, 58 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom linke Stirnseite
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : (Gewebe verkocht), offenbar Basaliom

14. B. Babette, 70 Jahre

Klin.Diag. : 5-markstückgroßes exulceriertes Karzinom linkes Scheitelbein
Vorg.Unters.: Atebrin, Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Adenoid differenziertes Basalzellenkarzinom

15. G. Fanni, 61 Jahre

Klin.Diag. : Pfennigstückgroßes Karzinom rechte Wange
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Spinobasocelluläres Karzinom mit massiver unspezifischer Entzündung

16. B. Frieda, 64 Jahre

Klin.Diag. : Cornu cutaneum linkes Ohr
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Umschriebene, sehr erheblich zellatypische Epithelhyperplasie mit massiver Parakera-

tose. Offenbar Praecancerose mit beginnender maligner Entartung im Sinne eines Plattenepithelkarzinoms.

17. S. Emma, 63 Jahre

Klin.Diag. : Hyperkeratose linke Stirnseite, Verdacht auf Praecancerose
Vorg.Unters.: Atebrin, Acror.cyt.,Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Alveolär-fasciculärer Naevuszellnaevus ohne Anzeichen einer malignen Entartung

18. F. Felix, 60 Jahre

Klin.Diag. : Senile Warze, Verdacht auf maligne Entartung
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Keratoakanthopapillom mit mäßiger infiltrativ-proliferativer Entzündung. Kein Anhalt für maligne Entartung

19. R. Therese, 70 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose der Mundschleimhaut
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Plattenepithelkarzinom mit geringer Verhornung

20. F. Katharina, 78 Jahre

Klin.Diag. : Exulceriertes Basaliom rechte Wange
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Basalzellenkarzinom

21. K. Julie, 70 Jahre

Klin.Diag. : Exulcerierter,derber, pfennigstückgroßer Tumor im Genitalbereich mit Verdacht auf maligne Entartung.
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Zellatypische Epithelhyperplasie mit Übergang in ein verhorntes Plattenepithel-Ca

22. M. Josef, 72 Jahre

Klin.Diag. : Verdacht auf Plattenepithelkarzinom in inguine
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Unreifes Plattenepithelkarzinom

23. K. Walter, 51 Jahre

Klin.Diag. : Basalzellenkarzinom rechte Wange
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Basospinozelluläres Karzinom

24. Ü. Alfred, 53 Jahre

Klin.Diag. : Verrucöse Praecancerose Knie
Vorg.Unters.: Acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Beträchtliche Epithelhyperplasie mit Übergang in unreifes Plattenepithelkarzinom

25. Ü. Alfred, 53 Jahre

Klin.Diag. : Verrucöse Praecancerose Gesäß
Vorg.Unters.: Acror.cyt., Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Papillomatöse Epithelhyperplasie mit Übergang in verhornendes Plattenepithelkarzinom

26. H. Emma, 64 Jahre

Klin.Diag. : Cornu cutaneum rechter Unterarm
Vorg.Unters.: Acror.cyt., Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Äußerst zellatypisches Keratoakanthopapillom, offenbar bereits im Sinne eines Plattenepithelkarzinoms entartet

27. St. Therese, 62 Jahre

Klin.Diag. : Hautkarzinom rechte Wange
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Intraepitheliales Plattenepithelkarzinom

28. T. Anna, 62 Jahre

Klin.Diag. : Plattenepithelkarzinom re Brustseite

Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Basalzellenkarzinom

29. D. Hildegard, 50 Jahre

Klin.Diag. : Naevuszellkarzinom linke Gesäßhälfte
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Alveolär-globulär wachsendes Naevuszellkarzinom

30. S. Konrad, 67 Jahre

Klin.Diag. : Verdacht auf Karzinom rechte Nasenseite
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Hyperplastisches sehr zellatypisches Epithel das in die Tiefe mit soliden Zellkomplexen dringt und bereits im Sinne eines Plattenepithelkarzinoms entartet ist

31. A. Konrad, 59 Jahre

Klin.Diag. : Basalzellenkarzinom-Rezidiv linker Nasenaugenwinkel
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Solid wachsendes, nur teilweise adenoid differenziertes Basalzellenkarzinom

32. E. Ida, 78 Jahre

Klin.Diag. : Plattenepithelkarzinom Stirn und re Hand
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Panopt.
Hist.Diag. : Primär bestrahlt

33. S. Georg, 70 Jahre

Klin.Diag. : Pfennigstückgroßes Basaliom li Stirnseite
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Unreifes Plattenepithelkarzinom im Initialstadium

34. H. Viktor, 64 Jahre

Klin.Diag. : Verrucöses Granulom linke Schläfe

Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Sehr zellatypisches Keratoakanthopapillom. Bereits beträchtliche maligne Entartung im Sinne eines Plattenepithelkarzinoms

35. K. Wilhelmine, 59 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose linke Schläfe
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Keratoakanthopapillom. Nochkeine sicheren Malignitätszeichen

36. Sch. Maria, 76 Jahre

Klin.Diag. : Großes, therapieresistentes Ulcus linker Unterschenkel. Karzinomverdacht
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Vorwiegend solid wachsendes undifferenziertes Plattenepithelkarzinom

37. B. Elsa, 45 Jahre

Klin.Diag. : Verdacht auf malignen fibromatösen Tumor über dem linken Jochbein
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Basaliom

38. S. Selma, 74 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose rechte Nasenseite
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Keratoakanthopapillom, noch keine sichere Malignität

39. K. Nikolaus, 49 Jahre

Klin.Diag. : Verdacht auf Basaliom rechter Unterarm
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Pigmentierter Naevus ohne Anzeichen für maligne Entartung

40. T. Georg, 46 Jahre

Klin-Diag. : Kraterförmiges Ulcus linke Ohrmuschel mit Karzinomverdacht
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist., Panopt.
Hist.Diag. : Verhornendes Plattenepithelkarzinom

41. R. Heinrich, 69 Jahre

Klin.Diag. : Exulceriertes Karzinom rechter Handrücken
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Plattenepithelkarzinom mit beginnender Verhornung

42. P. Babette, 70 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose rechte Stirnseite
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Hyperplasie der Epidermis, an einzelnen Stellen mit Verdacht auf Karzinom

43. E. Maria, 72 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose Unterlippe
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Spinobasozelluläres Karzinom

44. S. Konrad, 67 Jahre

Klin.Diag. : Karzinomrezidiv linker Nasenaugenwinkel
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Keine sicheren Malignitätszeichen. Atrophische Narbe mit sekundären Entzündungszeichen

45. K. Alois, 28 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom linke Wange
Vorg.Unters.: Atebrin, Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Beginnendes Plattenepithelkarzinom

46. S. Friedrich, 55 Jahre

Klin.Diag. : Seborrhoische Warze

Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Verruca mit beginnender maligner Entartung

47. G. Wilhelm, 40 Jahre

Klin.Diag. : Pigmentnaevus
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Naevus naevuszellularis ohne sichere Zeichen einer malignen Entartung

48. Sch. Johann, 61 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Plattenepithelkarzinom

49. L. Helga, 30 Jahre

Klin.Diag. : Leukoplakie Zungenspitze mit Verdacht auf beginnende maligne Entartung
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Ausgesprochene Verbreiterung der Epidermis mit Tiefenwachstum der Retezapfen. Unschärfe Begrenzung des Str.basale. Malignität nicht mit Sicherheit auszuschließen

50. T. Dorothea, 51 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Basaliom

51. Sch. Leonhard, 68 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose Unterlippe
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Epithelhyperplasie mit Tiefenwachstum der Retezapfen. Noch keine sichere Malignität

52. M. Margarete, 77 Jahre

Klin.Diag. : Taubeneigroßer karzinomverdächtiger Tumor linke Stirnseite

Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Plattenepithelkarzinom

53. B. Margarete, 78 Jahre

Klin.Diag. : Pfennigstückgroße Praecancerose linke Stirnseite
Vorg.Unters.: Atebrin i.m.,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Basaliom

54. B. Margarete, 68 Jahre

Klin.Diag. : Randrezidiv bei vorbestrahltem Wangen-Ca
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Beginnendes Plattenepithelkarzinom

55. D. Margarete, 61 Jahre

Klin.Diag. : Keratoakanthopapillom, Verd. auf Basaliom
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Basaliom

56. St. Franz, 66 Jahre

Klin.Diag. : Verd. auf bohnengroßes Karzinom Stirnmitte
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Leukämisches Infiltrat

57. B. Johann, 57 Jahre

Klin.Diag. : Lippenkarzinom Unterlippe
Vorg. Unters: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Verhornendes Plattenepithelkarzinom

58. T. Richard, 77 Jahre

Klin.Diag. : Exulceriertes Karzinom li Ohrläppchen
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Spinobasozelluläres Karzinom

59. A. Otto, 74 Jahre I

Klin.Diag. : Verdacht auf Karzinomrezidiv Kinn
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.

Hist.Diag. : Epithelhyperplasie, keine sicheren Malignitätszeichen

60. A. Otto, 74 Jahre II

Klin.Diag. : Verdacht auf Karzinomrezidiv re Wange
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Zellarmes wenig differenziertes Gewebe, wahrscheinlich vorbestrahlte Narbe

61. A. Otto, 74 Jahre III

Klin.Diag. : Verdacht auf Karzinomrezidiv li Ohr
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Basalzellenkarzinom

62. A. Otto, 74 Jahre IV

Klin.Diag. : Verdacht auf Karzinomrezidiv Nacken
Vorg. Unters: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Basaliom

63. M.-N. Anna, 68 Jahre

Klin.Diag. : Verrucöses Granulom Unterarm, Verdacht auf Neoplasma
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Verruca vulgaris, kein Anhalt f. Malignität

64. Schl.Willi, 51 Jahre

Klin.Diag. : Praecancerose Unterlippe
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Parakteratose und Akanthose. Noch kein sicherer Anhalt für Malignität

65. St. Josef, 62 Jahre

Klin.Diag. : Epithelioma basozellulare
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Spinobasozelluläres Karzinom

66. H. Else, 56 Jahre

Klin.Diag. : Verrucöses Granulom mit Verdacht auf Malignität
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Verhornendes Plattenepithelkarzinom

67. R. Max, 56 Jahre I

Klin.Diag. : Basaliom linker Augenwinkel
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Beginnendes Basaliom

68. R. Max, 56 Jahre II

Klin.Diag. : Basaliom rechter Nasenaugenwinkel
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Keratoakanthopapillom, keine sicheren Malignitätszeichen

69. R. Max, 56 Jahre III

Klin.Diag. : Basaliom Wange
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Plattenepithelkarzinom

70. Sch. Friedrich, 39 Jahre I

Klin.Diag. : Verdacht auf pfennigstückgroßes Malignom linke Stirnseite
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Beginnendes Plattenepithelkarzinom

71. Sch. Friedrich, 39 Jahre II

Klin.Diag. : Verd. auf Plattenepithelkarzinom li Schläfe
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Beginnendes Plattenepithelkarzinom

72. L. Hermine, 82 Jahre

Klin.Diag. : Exulceriertes Plattenepithelkarzinom Hand
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Alveolär-fasciculäres Plattenepithel-Ca

73. G. Richard, 61 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom von Kirschgröße rechte Stirn
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Keratoakanthopapillomatöse zellatypische Epithelhyperplasie mit Übergang in verhornendes Plattenepithelkarzinom

74. Ö. Martha, 68 Jahre

Klin.Diag. : Exulceriertes Plattenepithelkarzinom Stirn
Vorg. Unters: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Basalzellenkarzinom

75. B. Grete, 72 Jahre

Klin.Diag. : Exulceriertes Plattenepithel-Ca li Augenwinkel
Vorg.Unters.: Atebrin,Acror.cyt.,Acror.hist.,Panopt.
Hist.Diag. : Partiell adenoid differenziertes Basalzellenkarzinom

76. Sch. Lina, 74 Jahre

Klin.Diag. : Basaliom
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Basozelluläres Akanthopapillom ohne sichere Zeichen einer malignen Entartung

77. E. Hans, 72 Jahre

Klin.Diag. : Erbsengroßes Basaliom li Stirnseite
Vorg.Unters.: Acror.hist.
Hist.Diag. : Basaliom

Von den aufgeführten Patienten wurden 75 mit der histologischen Acridinorangefluorochromierung und 50 mit der cytologischen Acridinorangefluorochromierung untersucht. Die intravitale Atebrinfluorochromierung umfaßte 45 Untersuchungsfälle. Von allen cytologischen Ausstrichen wurden auch panoptisch gefärbte Präparate angefertigt. Bei den cytologisch

gefärbten Ausstrichen beträgt natürlich die Zahl der Ausstriche ein Vielfaches der angegebenen Fallzahl, da in jedem Untersuchungsfall mindestens je 5 Abstriche oder Tupfpräparate angefertigt wurden.

Befunde und Ergebnisse:

Die Histologie und Histopathologie der Haut ist heute Allgemeingut des Pathologen und histologisch tätigen Dermatologen und in den einschlägigen Lehrbüchern nachzulesen (HAMPERL (44), GANS u. STEIGLEDER (29)). Cytologische Untersuchungen der Haut sind dem gegenüber relativ selten. Da bei unseren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen oft auch morphologische Gesichtspunkte berücksichtigt werden mußten, ist es notwendig, kurz auf die Cytologie der normalen und pathologisch veränderten Haut einzugehen.

Normale und entzündlich veränderte Haut:

Die normale Haut ist cytologischen Untersuchungen gegenüber schwer zugänglich (STREICHER-SANDKÜHLER (89), eig. Untersuchungen). Falls nicht durch Punktion Zellen aus tieferen Gewebsschichten entnommen werden, - meist auch hier nur in sehr geringer Anzahl - , gelingt es meist nur, einzelne oberflächliche Epithelschuppen darzustellen. Im Punktions- und Abstrichpräparat finden sich die typischen oberflächlichen Epithelzellen, von der verhornten, polygonalen, kernlosen Epithelschuppe bis zu den unverhornten, mononukleären, grossen, polygonalen Plattenepithelien, die denen der Schleimhaut weitgehend gleichen. Daneben finden sich evtl. Talg- und Schweißdrüsenzellen und mitunter einzelne histioretikuläre Elemente und Zellen des peripheren Blutes.

Für cytologische Untersuchungen an der Haut sind im wesentlichen nur ulceröse und tumoröse Prozesse geeignet, die meist auch eine stärkere Desquamationstendenz als die normale Haut zeigen.

Bei Ulzerationen finden sich als Ausdruck einer unspezifischen chronischen Entzündung vorwiegend undifferenzierte

Histiozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Lediglich erstere können in ihren unreifen Formen bei reichlichem Vorkommen evtl. Sarkomzellen vortäuschen, sonst dürfte die cytologische Diagnose bei guter Ausstrichtechnik fast immer zu stellen sein.

Diesen allgemeinen cytologischen Befunden entspricht auch das cytologische Fluoreszenzpräparat. Im durch die Sperrfilter dunkler erscheinenden Gesichtsfeld zeigen sich bei normaler Haut nach Acridinorangefluorochromierung nur wenige, im Plasma schwach grün fluoreszierende Epithelzellen, deren Kerne sich je nach Dichte mehr oder weniger stark gelbgrün abheben und meist keine besonderen Strukturen zeigen. Kernlose verhornte Epithelschuppen zeigen starke, gleichförmige grüne Fluoreszenz. Leuchtend grün bis gelbgrün fluoreszieren die Kerne der Granulo- und Lymphozyten. Ihr Cytoplasma hebt sich als ganz schmaler, dunkler Saum kaum ab oder ist überhaupt nicht zu erkennen. Erythrocyten fluoreszieren nicht, dagegen zeigen Bakterien stark gelbe bis leuchtend rote Fluoreszenz ebenso wie evtl. vorkommende Pilze.

Bei unspezifischen Ulzerationen überwiegen, dem allgemeinen cytologischen Befund entsprechend, die leuchtend grünen Granulo- und Lymphozytenkerne. Daneben finden sich aber auch zahlreiche undifferenzierte Histiozyten, deren ovale Kerne deutlich grüngelb, nur selten rötlichbraun, fluoreszieren und oft etwas gelockerte gröbere Struktur erkennen lassen. Das Cytoplasma ist selten zu erkennen oder fluoresziert schwach grüngrau, in seltenen Fällen rötlichbraun. Die gelegentlich vorkommenden Mastzellen und Plasmazellen zeigen leuchtend gelbgrün fluoreszierende Kerne und oft ein bräunlichrotes, häufig auch ein stärker rotgefärbtes Cytoplasma. Überaus selten waren etwas kleinere, rundliche oder rundovale Zellen mit relativ lockeren, etwas großen, gelbgrün fluoreszierenden Kernen und schwach gelbgrün, gelborange oder bräunlich-orange bis braunrot fluoreszierendem Cytoplasma, die phasenkontrastoptisch oder in umgefärbten Präparaten als Basalzellen oder Parabasalzellen (tiefe Zellen des Stratum

spinosum) anzusprechen waren. Auch auto- oder heterolytisch veränderte Zellen zeigten gelegentlich eine schmutzig bräunlich-orange bis bräunlich-rote Plasmafluoreszenz. (S.Tab.2)

Erleichtert wird auch hier die Bestimmung einzelner Zellelemente dadurch, daß die zahlreich vorkommenden Erythrozyten, die selbst nicht nennenswert fluoreszieren, nicht störend wirken.

Hautkarzinome:

Als Folge der immer mehr an Bedeutung gewinnenden gynäkologischen und allgemeinmedizinischen cytologischen Krebsdiagnostik mehrten sich auch die cytologischen Untersuchungen an Hautkarzinomen (HAUSER (48), KNOTH (54), TZANK (94), ZOON u. MALI (108)). Die außerordentliche Desquamationstendenz des Tumorgewebes (HARTMANN (46), COMAN (20), HAUSER (48)) erleichtert hierbei die Untersuchungen und führt zu sehr zellreichen Ausstrich- und Tupfpräparaten.

Obgleich bei der cytologischen Untersuchung das Verhältnis der Zellen zueinander und gegenüber dem umgebenden Gewebe nicht beurteilt werden kann, sodaß erst eine Vielzahl von Malignitätskriterien bei mehreren Zellen synoptisch eine Diagnosestellung erlaubt, gibt es doch cytologische Befunde von hoher Wahrscheinlichkeit (HARTMANN (46), HAUSER (48), STREICHER-SANDKÜHLER (89), TZANK (94)). Gerade die beiden primären Hautkarzinome, das basozelluläre und spinozelluläre Karzinom, können mit größter Wahrscheinlichkeit cytologisch diagnostiziert werden (HAUSER (48), STREICHER-SANDKÜHLER (89), eigene Untersuchungen). Dabei zeichnet sich der Basalzellenkrebs durch auffällige Monomorphie seiner rundlichen und ovalen Zellen und Zellkerne, die oft in Trauben- oder Palisadenform angeordnet sind, aus. Die Kerne sind sehr dicht, basophil, gelegentlich etwas polyedrisch und zeigen regelmäßige, dichte Struktur. Die Kerngröße überschreitet mit 10-15 u wesentlich die der normalen Hautzellen. Meist ist ein singulärer, relativ kleiner, nicht sehr intensiv gefärbter Nukleolus vorhanden, selten 2 oder mehr. Ausgesprochene Malignitätskrite-

rien fehlen cytologisch meist, was dem oft jahrelang relativ benignen Charakter des Tumors entspricht.

Anders ist es beim spinozellulären Karzinom. Neben häufig auftretenden Zeichen der Verhornung finden sich hier alle cytologischen Zeichen der typischen Malignität, insbesondere Zell- und Kernpolymorphie, große, oft multiple Nukleolen, erhöhte Kernplasmarelation und Kern-Körperchenrelation etc. Die malignen Zellen sind infolge der erhöhten Desquamationstendenz relativ zahlreich und liegen meist einzeln oder in kleinen, unregelmäßig angeordneten Verbänden. Oft ist auch eine Polychromasie des Cytoplasmas und beginnende Verhornung zu erkennen. Die cytologische Diagnose ist bei guten Ausstrichen meist leicht.

Diese genannten morpholigischen Kennzeichen der Krebszelle sind auch mit der Methode der Acridinorangefluorochromierung bei Einhaltung bestimmter Färbebedingungen gut zu erkennen und zu beurteilen (DART u. TURNER (21)), SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (84), BERTALANFFY (11, 10), ELEVITCH u. BRUNSON (24), SUSSMANN (92), WELLMANN (99), eig. Untersuchungen). Die fluoreszierenden Zellen und ihre strukturellen Einzelheiten heben sich vom dunklen Gesichtsfeld sehr scharf ab. Entsprechend der Fluoreszenzmetachromasie des Acridinorange kommt es zu verschiedenen Fluoreszenzfarben, die uns neben den morphologischen Kriterien eine zusätzliche Differenzierung erlauben.

Neben den bei der Cytologie der normalen Haut vorkommenden und beschriebenen Zellelementen finden sich in den von Hautkarzinomen angefertigten Tupf- bzw. Ausstrichpräparaten in der Regel, entsprechend der Desquamationstendenz des Gewebes mehr oder weniger häufig, Zellen mit leuchtend roter oder rotoranger Cytoplasmafluoreszenz, die dem Untersucher bei den sonst vorherrschenden grünen und gelbgrünen Fluoreszenzfarben sofort auffallen. Diese cytoplasmatische Rotfluoreszenz kann je nach Art des Karzinoms bei allen in der Haut vorkommenden maligne entarteten Zellen beobachtet werden. So finden sich beim verhornenden Plattenepithelkarzinom reich-

lich atypische, im Cytoplasma rot fluoreszierende oberflächliche Plattenepithelzellen, beim Basalzellenkarzinom die den Basalzellen entsprechenden Formen mit cytoplasmatischer leuchtender Rotfluoreszenz, jeweils mit den entsprechenden cytomorphologischen Malignitätskriterien. Es handelt sich meist um eine homogene, leuchtende Rotfärbung, die aber innerhalb eines Präparates und einer Zellart an Intensität und oft auch in der Farbtönung nicht durchwegs völlig einheitlich ist.

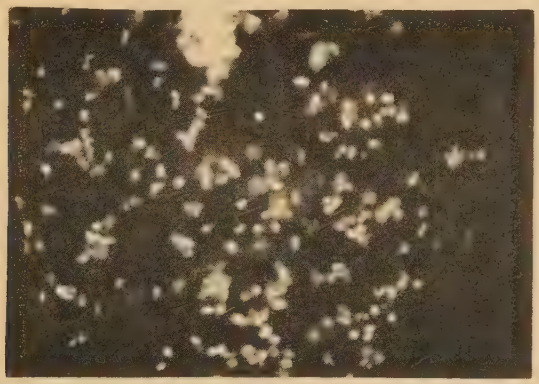


Abb.1: Acridinfluorochromiertes cytologisches Präparat eines basospinocellulären Karzinoms. Vergr. 200x (Farbbild vom Diapositiv)

Bei dunklen Rottönen kann beim Basalzellenkarzinom die Differenzierung gegenüber den gelegentlich auch bei normaler Haut vorkommenden Basal- und Pasabasalzellen mit dunkeloranger oder braunroter schmutziger Fluoreszenzfarbe mithilfe der Farbe allein oft schwierig oder sogar unmöglich sein, besonders dann, wenn die Zellen sehr vereinzelt vorkommen. Gleiches trifft beim Vorkommen von auto- oder heterolytisch veränderten Zellen zu (s. Abb. 1). Dann ist die Einordnung nur durch zusätzliche morphologische Beurteilung aller Zellbe-

standteile möglich. Es finden sich in den Karzinomzellen gleichzeitig stark gelbgrün bis gelb fluoreszierende Kerne, die sich nach Form, Größe und Struktureinzelheiten meist gut beurteilen lassen. Sehr oft zeigen die Kerne feine rötliche Granulationen von wechselnder Stärke und Dichte, sowie gelegentlich größere, runde, rotfluoreszierende Einschlüsse, die als Nukleolen zu deuten sind. Diese rotfluoreszierenden Kernstrukturen sowie die cytoplasmatische Rotfluoreszenz entsprechen offensichtlich der Lokalisation der hier vermehrt vorkommenden Ribonukleinsäure, wie oben beschrieben wurde, wogegen die Desoxyribonukleinsäure der Chromatinstruktur leuchtend gelbgrün bis gelb fluoresziert.

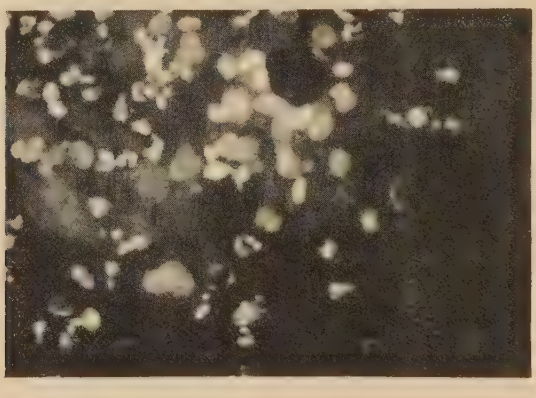


Abb.2: Acridinfluorochromiertes Präparat eines Plattenepithelkarzinoms.Vergr.400x (Farbbild vom Diapositiv)

Die cytoplasmatische Rotfluoreszenz wurde von BERTALANFFY als "Warnsignal" bezeichnet, was zumindest insoweit richtig ist, als sie sofort den Blick des Mikroskopierenden auf die rotfluoreszierende Zelle lenkt und somit ein rasches Auffinden und eine schnellere morphologische Beurteilung, besonders bei verstreuter und vereinzelter Lagerung,ermöglicht. (Abb.2)

Wiederholt beobachteten wir bei unseren Untersuchungen auch grünfluoreszierende Zellen, die rein morphologisch durchaus als Krebszellen imponierten, aber jegliche cytoplasmatische Rotfluoreszenz vermissen ließen. Cytoplasmatische Rotfluoreszenz ist bei allen maligne erscheinenden Zellen eines Karzinoms im Ausstrich somit keineswegs obligatorisch (Abb.2).

Tabelle 2:
Fluoreszenzfarben der bei normaler oder entzündlich veränderter Haut vorkommenden Zellen bei der cytologischen Acridinorangefluorochromierung

Zellart	Fluoreszenzfarbe	
	Plasma	Kern
Oberfl.Hornschuppe	stark grün	--
Oberfl.Plattenepithelzelle	graugrün bis grün	gelbgrün
Spinalzelle	grün bis grüngelb	gelbgrün
Parabasalzelle und Basalzelle	gelbgrün bis dunkelorange od. braunrot	gelbgrün
Autolytisch veränderte Zelle	grün bis dunkel orangerot oder braunrot	grün bis gelbgrün
Erythrocyten	--	--
Leukocyten	keine od. blasser graugrüner Schatten	leuchtend grün
Unreife u. reife Histiocyten	schwach graugrün od. rotbraun bis rot	gelbgrün bis gelb
Mastzellen	leuchtend rot	gelb
Bakterien o.Pilze	gelborange od. rot	--

Die außerordentliche Brillianz und Farbschönheit der fluoreszenzmikroskopischen Bilder, die selbst gute Diäpositive wegen der relativ langen Belichtungszeiten nicht völlig wiederzugeben vermögen, kann sich allerdings bei starker Strahlungsintensität, wie es bei der von uns verwendeten Methode der Fall

ist, und gehäufter Lagerung der Krebszellen durch Überstrahlungen für die Beobachtung struktureller Einzelheiten als nachteilig erweisen. So kann z.B. ein großer Verband von Karzinomzellen als stark rotgelb leuchtender, kaum Einzelstrukturen erkennen lassender Fleck imponieren. Eine gute Ausstrichtechnik ist daher Grundbedingung. Starke bakterielle Verunreinigungen, besonders in Nativpräparaten, können durch die leuchtende Gelborange- oder Rotfluoreszenz der Bakterien u.U. ebenfalls die Beurteilung stören.

Tabelle 3:

Fluoreszenzfarben bei der cytologischen Acridinorange-fluorochromierung von Hautkarzinomen

Zellart	Fluoreszenzfarbe	
	Plasma	Kern
Spinalzellenkarzinomzelle	gelbgrün o.orangerot bis stark rot	intensiv gelbgrün bis gelb
Basalzellenkarzinomzelle	orangerot bis rot	intensiv gelbgrün bis gelb
Nicht einzuordnende mono- u. polymorphe Karzinomzelle	gelbgrün bis orangerot bis stark rot	intensiv gelbgrün bis gelb

Bei den atebrinfluorochromierten cytologischen Ausstrichen fand sich weder in den nativen, noch in den fixierten Präparaten eine wesentliche Fluoreszenz. Das Cytoplasma der Epithelzellen fluoreszierte schwach grüngrau, die Kerne hoben sich kaum ab, oder wurden deutlich ausgespart. Die schwache Fluoreszenz war oft nur bei längerer Adaptation und im Blaulicht bei kleiner bis mittlerer Vergrößerung zu beobachten. Die Bildung von intraplasmatischen Granula gelbgrüner oder gelboranger Färbung, wie sie in der Literatur bei mit basi-

schen Fluorochromen vitalgefärbten Nativzellpräparaten beschrieben wird (WITTEKIND (104), HENNING u. WITTE (50), WITTE 102)), war nicht zu beobachten. Außerdem blaßte die vorhandene Grünfluoreszenz zusätzlich stark ab, entsprechend der im Phasenkontrast zu beobachtenden Auto- und Heterolyse der Zellen, die durch den schädigenden Einfluß der kurzwelligen Erregerstrahlung (STRUGGER (90)) außerordentlich beschleunigt wird.

In Einzelfällen, besonders bei stark fortgeschrittenen, großen, exulcerierten Plattenepithelkarzinomen war die Fluoreszenz mancher Zellen etwas stärker, aber nicht so signifikant, daß eine eindeutige Diagnose zu stellen gewesen wäre. Die Fluoreszenz reichte nicht aus, um gleichzeitig morphologische Kennzeichen der Zelle näher zu bestimmen. Sie diente lediglich dazu, die Zellen aufzufinden, um sie dann im Phasenkontrast zu beurteilen.

Von außerordentlicher Farbenpracht und Brillianz sind hingegen die mit Acridinorange fluorochromierten histologischen Schnitte. Daß die geringe Farbstoffkonzentration eines einzigen Farbstoffes infolge Fluoreszenzmetachromasie Bilder mit solchen Farbkontrasten und solcher Leuchtkraft hervorrufen kann, ist erstaunlich. Leider ist die photographische Wiedergabe nur ein unvollständiges Abbild der wirklichen Farbfreudigkeit der Präparate, die höchstens im Diapositiv eben erkennbar ist. Auch das bis jetzt noch nicht geklärte Problem der Herstellung von Dauerpräparaten ist allein schon aus diesem Grunde bedauerlich.

Im Gegensatz zu den vorwiegend grünen und blaugrünen Farbtönen der Eigenfluoreszenz ungefärbter Hautschnitte mit nur geringen Helligkeitsunterschieden ist in fluorochromierten histologischen Präparaten eine Differenzierung der einzelnen Hautschichten und Hautbestandteile schon durch die verschiedenen Fluoreszenzfarben leicht möglich. (Abb.3)

Bei der von uns verwendeten Methodik zeigten sich im histologischen, mit Acridinorange fluorochromierten Schnitt folgende Fluoreszenzfarben:

Epidermis	gelborange, oft rotorange, selten grünorange oder gelbgrün
Str.corneum	meist leuchtend grün, oft auch grünorange bis tiefrot
Str.lucidum	intensiv leuchtend grün
Str.granulosum	gelbgrün bis gelborange mit bräunlich-schwarzen Granula
Str.spinosum	gelbgrün oder gelborange, seltener rotorange
Str.basale	gelb, gelborange bis rotorange
Zellgrenzen	meist dunkel ausgespart
Zellkerne	dunkel, bräunlich-gelb, oft wie von der Fluoreszenz ausgespart mit leuchtend gelben,hellen Nukleolen
Subcutis	leuchtend grün (vorallem die elastischen und kollagenen Fasern)
Leuko-u.Lymphocyten	leuchtend gelborange oder grüngelb
Mastzellen	leuchtend rot
Talgdrüsen	gelbbraune bis schwarze wabige Zellen mit leuchtend gelben Kernen und dunkelbrauner Granulation
Haarpapillen	gelborange
Haarschaft	grün oder grünorange bis tiefrot
Gefäßbindegewebe	leuchtend grün
Gefäßendothelien	leuchtend orange
Fettgewebe	tiefrotes wabiges Netz

Die Farben können auch in einer Färbeserie unter Einhaltung gleicher Färbebedingungen etwas schwanken, was offensichtlich schon durch die vorherige Verarbeitung und die Schichtdicke, sowie die Art des Gewebes bedingt ist. Doch ist die Differen-

zierung der einzelnen Gewebsbestandteile durch den Kontrast der einzelnen Farben untereinander stets leicht, zumal sich auch alle morphologischen Einzelheiten sehr gut erkennen und beurteilen lassen.

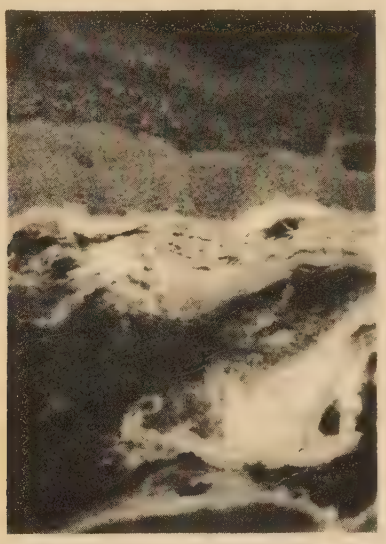


Abb.3: Mit Acridinorange fluoroschromierter histologischer Schnitt eines Spinalzellenkarzinoms

Bei den mit Acridinorange fluorochromierten histologischen Schnitten von Hautkarzinomen fand sich für die karzinomatösen Gewebsbezirke keine spezifische und gleichbleibende Fluoreszenzfarbe. Die Färbung schwankte von grüngrauen und grüngelben Zellzügen, - besonders bei Spinalzellenkarzinomen, evtl. mit leuchtend grünen, eingeschlossenen Hornmassen (s.Abb.3) -, bis zu den oft mehr gelben, orangen oder orangeroten Gewebspartien der Basalzellenkarzinome. Eine Unterscheidung dieser beiden Karzinomformen aufgrund der Farbe allein ist aber nicht

möglich.Hinsichtlich der Farbe stellt sich bei histologischen, mit Acridinorange fluorochromierten Schnitten ein Karzinom nicht selektiv dar. Die Diagnose erfolgt hier ebenfalls nach histomorphologischen und histopathologischen Gesichtspunkten.

Allerdings wird durch die Verschiedenheit der Fluoreszenzfarben der einzelnen Gewebsbestandteile die Abgrenzung von normalen und pathologischen Gewebsbezirken oft erleichtert. Unscharfe Zell- und Gewebsgrenzen, infiltratives Wachstum und Zellatypen sind meist rasch zu erkennen. Es kann jedoch bei großen, sehr stark leuchtenden Gewebspartien durch mögliche leichte Überstrahlung die Differenzierung einzelner Karzinomzellen und ihrer morphologischen Kennzeichen gelegentlich erschwert werden. Die typischen histologischen Merkmale wie das infiltrative und destruierende Wachstum sind aber häufig schon auf den ersten Blick zu lokalisieren.

Bei sehr hellen Präparaten, die evtl. zu Überstahlungen neigen, empfiehlt sich die Verwendung von UV-Licht als Erregerstrahlung. Bei diesem ist zwar die Intensität der Fluoreszenzstrahlung geringer, dafür sind aber Struktureinzelheiten meist besser zu erkennen, als es im sehr hellen Blaulicht gelegentlich der Fall ist. Wesentliche Unterschiede in der Färbung ergeben sich bei den beiden Methoden nicht. Bei der Beobachtung im Blaulicht herrscht lediglich der gelborange Farbton etwas vor, mitbedingt durch den vorgeschalteten orangegelben Sperrfilter.

Untersuchungsergebnisse:

Mithilfe der panoptisch gefärbten cytologischen Kontrollpräparate konnten wir bei den 50 von uns untersuchten Fällen, die klinisch den Verdacht auf ein beginnendes oder bereits fortgeschrittenes Hautkarzinom erweckten, in 38 Fällen (76%) die richtige Diagnose stellen. Dabei handelte es sich, wie aus der Liste der Fälle zu ersehen ist, um basozelluläre, spinozelluläre, spinobasozelluläre und undifferenzierte Plattenepithelkarzinome. 31 Fälle, die später histologisch als Karzinome bestätigt wurden, konnten richtig als "positiv", d.h. mit größter Wahrscheinlichkeit oder sicher Vorliegen eines Karzinoms (Gruppe IV und V nach PAPANICOLAOU), erkannt

werden. In 6 der 37 Fälle wurde später bei der histologischen Untersuchung ein Karzinom verneint. Die gleichen Fälle wurden auch vorher cytologisch als "negativ" bezeichnet (Gruppe I nach PAPANICOLAOU). Ein Fall, der histologisch kein Karzinom darstellte, wurde als "wahrscheinlich negativ" angesprochen (s.u.). Bei 3 weiteren der 50 Fälle wurde ebenfalls die Diagnose "negativ" gestellt, da im cytologischen Präparat keine karzinomverdächtigen Zellen aufzufinden waren, obgleich später die histologische Untersuchung eine "beginnende maligne Entartung" ergab. Diese 3 Fälle sind also als "fälschlich negativ" zu werten.

Bei insgesamt 10 der 50 Fälle, einschließlich des obengenannten Einzelfalles, fanden sich cytologisch zwar vereinzelte Zellatypien, die aber nicht genau einzuordnen waren und noch nicht mit ausreichender Sicherheit als Malignitätskriterien gewertet werden konnten, sodaß die Diagnose Karzinom gerechtfertigt gewesen wäre. Diese Fälle wurden als "wahrscheinlich negativ" bezeichnet (Gruppe II nach PAPANICOLAOU). Es handelte sich hier ausschließlich um sehr kleine, teilweise stark verhornte Hautveränderungen, die cytologisch nur sehr zellarme Abstriche oder Tupfpräparate ergaben. Mit Ausnahme des genannten Einzelfalles, der histologisch ein nicht malignes Narbengewebe als Zustand nach excidiertem Malignom darstellte, ergab der histologische Befund stets eine beginnende maligne Entartung. Deshalb ist leicht erklärlich, daß bei den cytologischen Ausstrichen keine oder nur sehr wenige Zellen mit Malignitätskriterien vorkamen und diese bei der panoptischen Färbung entweder nicht aufgefunden wurden oder zur Stellung einer Diagnose nicht ausreichten. Diese 9 Fälle sind somit ebenfalls als "fälschlich negativ" zu werten.

Insgesamt konnte also in 12 von 50 Fällen keine sichere oder sogar nur eine falsche cytologische Diagnose gestellt werden, was 24 % "fälschlich negative" Fälle mit der Methode der panoptischen Färbung ergibt. (Siehe Diagramm 1 und 1a)

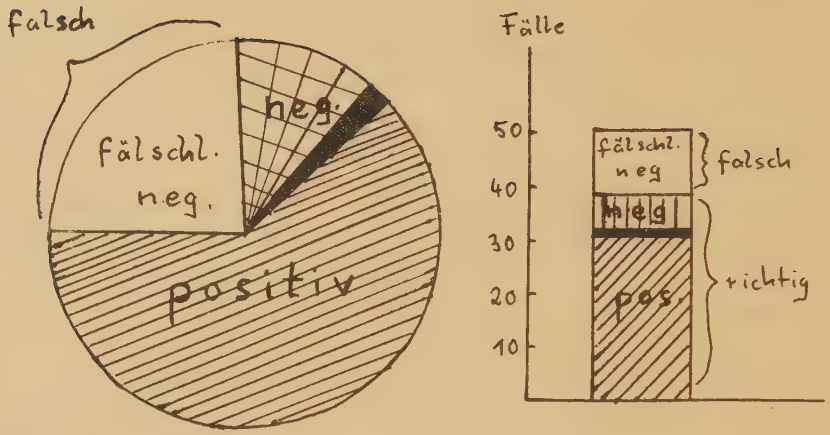


Diagramm 1 und 1a: Ergebnisse der panoptischen Färbung

In der fluoreszenzmikroskopischen Cytodiagnostik wurde bei 45 Patienten die intravitale Atebrinfluorochromierung durchgeführt. In 40 Fällen war keine nennenswerte Fluoreszenz zu beobachten. Eine Diagnose war somit fluoreszenzmikroskopisch nicht zu stellen. Die Präparate mußten als "Negativ" gewertet werden. 4 von diesen Fällen ergaben auch später kein Karzinom, sodaß 4 "negativen", richtig beurteilten Fällen, 36 "fälschlich negative" gegenüber standen.

Nur in 5 Fällen, die alle klinisch und histologisch stärker fortgeschrittene Plattenepithelkarzinome darstellten, fand sich eine etwas stärkere grüngraue bis leicht grünlichgelbe Fluoreszenz von Zellen, die phasenoptisch als tumorverdächtig anzusprechen waren. Die Darreichungsform des Atebrin spielte dabei keine Rolle. Erst bei längerem, gleichzeitigem Vergleich mehrerer Präparate konnte hier die Diagnose "wahrscheinlich positiv" gestellt werden, wobei aber stets zur endgültigen Beurteilung die Phasenkontrastbeobachtung heran-

gezogen wurde.

Insgesamt müssen unsere Versuche der intravitalen Atebrinfluorochromierung von Hautkarzinomen als unbrauchbar bezeichnet werden. Die Methode ist für die Cytodiagnostik von Hautkarzinomen nicht geeignet. Auch eine Erhöhung der Dosis um 50 - 100 % auf 1,5 g per os oder 1,2 g i.m. brachte keine wesentliche Verbesserung der Ergebnisse und war nur in wenigen Fällen durchführbar, da es sich meist um ältere Patienten handelte, bei denen eine höhere Dosis nicht zumutbar oder wegen Nebenwirkungen nicht möglich war. Fluoreszenz der Leukozytenkerne war bei den atebrinfluorochromierten Präparaten nicht zu beobachten.

Bei der cytologischen Acridinorangefluorochromierung wurden die Fälle nach 2 Gesichtspunkten ausgewertet: Erstens nach dem Vorkommen von cytoplasmatischer Rotfluoreszenz im Sinne des amerikanischen "prescreening", d.h. der Vorauswahl cytologischer Präparate aufgrund rotfluoreszierender Zellen, und zweitens nach cytomorphologischen Kriterien.

Bei der Beurteilung nach der Rotfluoreszenz der Zellen konnte in 39 von 50 Fällen (78%) leuchtend rote oder leuchtend rotorange cytoplasmatische Fluoreszenz bei zumindestens mehreren, meist bei zahlreichen Zellen eines jeden Präparates beobachtet werden. in 4 weiteren Fällen fanden sich zahlreiche, etwas dunkler gefärbte, aber deutlich rotorange und rotbraune Zellen. Insgesamt waren also 43 von 50 Fällen (86%) "rotpositiv". Die morphologische und später die histologische Kontrolle zeigte, daß davon 2 Fälle kein Karzinom darstellten, also fälschlich als "positiv" bezeichnet wurden(4%). Es handelte sich in einem Fall um einzelne, kleine, gruppenförmig angeordnete, rotfluoreszierende Zellen beim Abstrich eines leukämischen Infiltrates, die morphologisch als pathologische Leukozytenformen anzusprechen waren und im zweiten Fall um einzelne rotfluoreszierende Zellgruppen bei einem Bestrahlungsulcus. Letztere Zellen wurden morphologisch als junge Bindegewebszellen gedeutet.

7 Fälle zeigten keine Zellen mit cytoplasmatischer Rotfluoreszenz; sie wurden als "negativ" gewertet. Von die-

sen konnte in 5 Fällen auch histologisch ein Karzinom ausgeschlossen werden, 2 wurden histomorphologisch als Karzinome diagnostiziert. 2 der 7 Fälle sind also als "fälschlich negativ" zu werten.

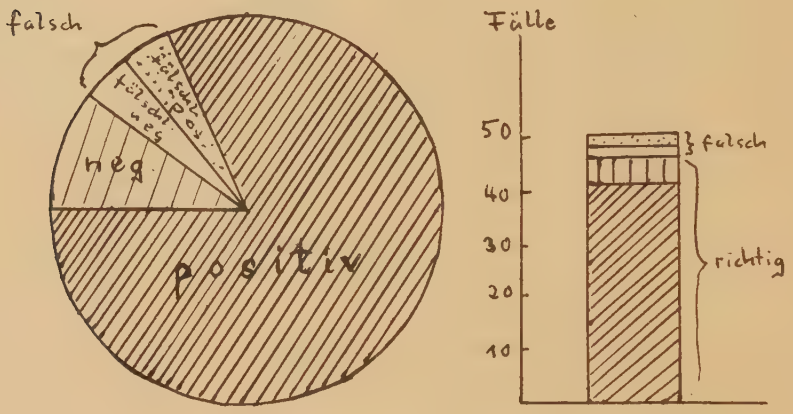


Diagramm 2 und 2a : Ergebnisse bei der cytologischen Acridinorangefluorochromierung unter Berücksichtigung lediglich der Rotfluoreszenz

Allein aus dem Vorkommen oder Fehlen der Rotfluoreszenz konnte also in 46 von 50 Fällen die richtige Diagnose gestellt werden (92 %), wenn das " Warnsignal Rot " als diagnostisches, krebsspezifisches Kriterium gewertet wurde (s. Diagramm 2 und 2a).

Bei Vernachlässigung der Rotfluoreszenz und alleiniger Beurteilung nach cytomorphologischen Kriterien konnten 35 Fälle richtig als " positiv ", d.h. als Karzinom, diagnostiziert werden. 4 Fälle wurden als " wahrscheinlich positiv " bezeichnet. Sowohl die " positiven " als auch die " wahrscheinlich positiven " Fälle konnten histologisch als Karzinome bestätigt werden.

Von den 11 Fällen, bei denen mittels der Acridinorangefluorochromierung keine sicheren oder wahrscheinlichen Malignitätszeichen zu erkennen waren und die deshalb als " negativ " bezeichnet wurden (22 %), waren 4 Fälle " fälschlich negativ ", da die histologische Untersuchung bei diesen 4 Fällen ein Karzinom ergab. Es handelte sich hierbei um beginnende maligne Entartung. Bei den restlichen 7 Fällen konnte auch histologisch kein Karzinom nachgewiesen werden.(s.Diagramm 3 und 3a)

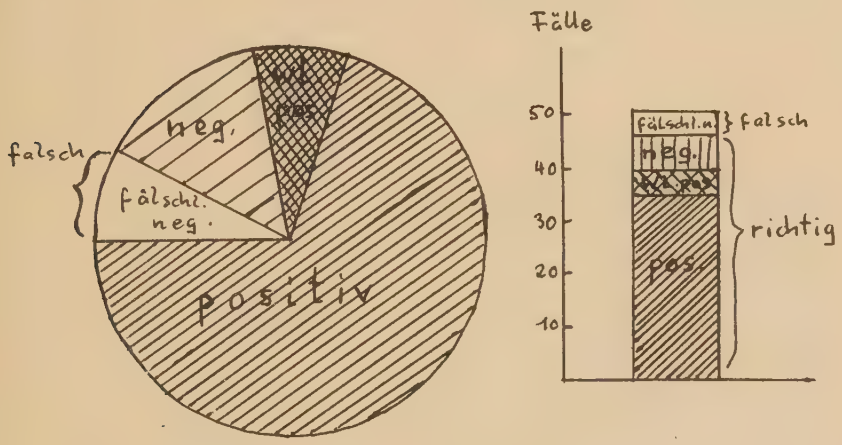


Diagramm 3 und 3a : Ergebnisse bei der cytol. Acridinorangefluorochromierung unter alleiniger Berücksichtigung morphologischer Kriterien.

Wurden sowohl die Rotfluoreszenz als auch die morphologischen Kriterien zur Beurteilung herangezogen, wie es unseres Erachtens erstrebenswert und notwendig ist, ergab sich folgendes Resultat:

Es gelang in 47 von 50 Fällen (94 %) die richtige Diagnose zu stellen. Davon wurden 6 Fälle, die histologisch keine Malignitätszeichen aufwiesen, auch cytologisch eindeutig als " negativ " erkannt, die übrigen 36 richtigerweise als eindeutig " positiv ". Bei 4 Fällen, die später auch hi-

stologisch als Karzinome diagnostiziert wurden, lautete die cytologische Diagnose " wahrscheinlich positiv ", bei einem Fall"wahrscheinlich negativ". Letzterer Fall stellte histologisch einen Zustand nach bestrahltem Karzinom ohne Malignitätszeichen dar. In 3 Fällen wurde ebenfalls die Diagnose " wahrscheinlich negativ " gestellt, da nur eine sehr schwache cytoplasmatische Rotfluoreszenz bei einigen wenigen Zellen der Ausstriche zu beobachten war, sodaß die Zellen nicht mit ausreichender Wahrscheinlichkeit cytomorphologisch als maligne bezeichnet werden konnten. Histologisch handelte es sich dabei durchwegs um sehr kleine Hautkarzinome im Initialstadium. Diese 3 Fälle sind also als " fälschlich negativ" zu werten. (s. Diagramm 4 und 4a)

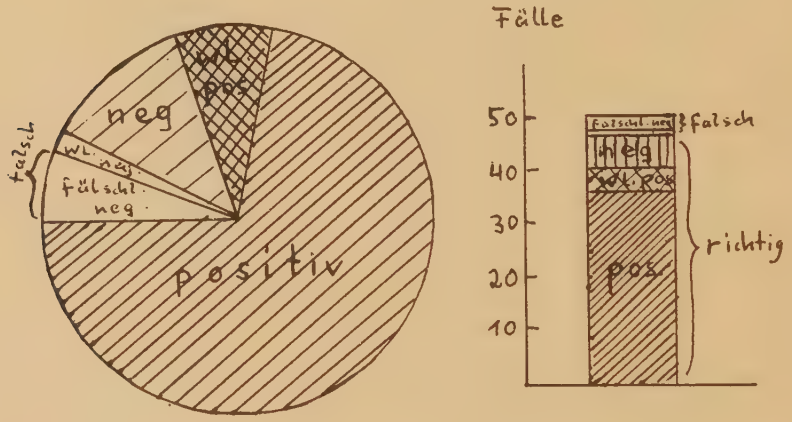


Diagramm 4 und 4a : Ergebnisse bei der cytol. Acridinorangefluorochromierung unter gleichzeitiger Berücksichtigung färberischer und morphologischer Kriterien

Auf den ersten Blick könnten die angegebenen Zahlen dazu verleiten, die Methode des " prescreening ", d.h. der Beurteilung allein nach der cytoplasmatischen Rotfluoreszenz, der

kombinierten Methode mit gleichzeitiger Berücksichtigung cytomorphologischer Zellmerkmale gleichzustellen, ja evtl. sogar der Einfachheit halber auf eine zusätzliche cytomorphologische Beurteilung völlig zu verzichten. Es muß deshalb in Übereinstimmung mit DART u. TURNER (21), SCHÜMMELFEDER (81, 84), UMICKER, PICKLE u. WAITE (95), WELLMANN (99) u.a. nochmals hervorgehoben werden, daß, wie oben beschrieben, auch andere, sicher nicht maligne Zellen mit erhöhter Stoffwechselaktivität Rotfluoreszenz zeigen können und umgekehrt Karzinomzellen u.U. aus nicht sicher bekannten Gründen in seltenen Fällen eine Rotfluoreszenz vermissen lassen. Banal ausgedrückt, macht " eine rotfluoreszierende Zelle noch kein Karzinom". Man muß also stets mehrere rotfluoreszierende Zellen beobachtet haben, um einen ausreichenden Verdacht äußern zu können, der erst anhand der cytomorphologischen Kennzeichen bestätigt oder entkräftigt werden kann. Erst die synoptische Beurteilung nach Farbe und Morphologie verleiht der jeweiligen cytologischen Diagnose erhöhte Aussagekraft.

Bei den mit Acridinorange fluorochromierten histologischen Schnitten erfolgte, wie oben erwähnt, die Beurteilung nach histomorphologischen Kennzeichen, wogegen die Fluoreszenzfarbe infolge der verschiedenen Anfärbung einzelner Gewebsbestandteile zur schnelleren allgemeinen Orientierung beitrug und oft besondere Erscheinungen im Gewebe, wie entzündliche Infiltrate, eingeschlossene Hornmassen etc., sofort markierte. Die endgültige Diagnosestellung erfolgte aber nach den in der Histologie üblichen Gesichtspunkten und führte bei den guten Färbeergebnissen mit Acridinorange zu entsprechend guten Resultaten.

Von 75 untersuchten Fällen konnten 72 richtig diagnostiziert werden. Bei 59 Fällen lautete die Diagnose "positiv", d.h. Karzinom, hier soweit möglich unter genauerer histologischer Differenzierung nach Art und Ausdehnung des Karzinoms, wobei jeweils die Diagnose mit der üblichen histologischen Diagnose, z.B. Keratoakanthopapillom, leukämisches Infiltrat, Naevuszellnaevus etc. richtig gestellt werden konn-

te. 3 Fälle wurden als "wahrscheinlich negativ" bezeichnet. Diese ergaben auch bei der H.-E.-Färbung keine sichere Malignität. In einem Fall konnte bei einer sehr oberflächlichen Excision bei der H.-E.-Färbung eine " Malignität nicht sicher ausgeschlossen " werden. Dieses Präparat wurde bei der Acridinorangefluorochromierung als " wahrscheinlich positiv " bezeichnet.

Bei entsprechender Erfahrung mit der histologischen Fluorochromierung sind also bei der histologischen Diagnostik von Hautkarzinomen etwa gleiche Ergebnisse zu erzielen wie bei der bisher üblichen histologischen Methodik. Aufgrund der guten Darstellung der histopathologischen Strukturmerkmale des Gewebes sind bei den acridinorangefluorochromierten histologischen Schnitten auch differentialdiagnostisch die gleichen Schlüsse möglich.

In der nun folgenden tabellarischen Übersicht haben wir die Ergebnisse der von uns durchgeführten einzelnen Untersuchungen zusammengefaßt und gegenübergestellt.

In der Tabelle geben die Zahlen vor den Klammern die einzelnen Fallzahlen, die Zahlen in den Klammern die daraus errechneten Prozentwerte an.

Neben den bisher schon verwendeten Abkürzungen wurden noch folgende benützt:

presc. = "prescreening", d.h. Beurteilung nur nach der cytoplasmatischen Rotfluoreszenz

morph. = morphologische Beurteilung bei der cytologischen Acridinorangefluorochromierung ohne Berücksichtigung der Rotfluoreszenz

komb. = Kombination der beiden vorhergehenden Methoden. Beurteilung sowohl nach cytomorphologischen als auch nach färberischen Kriterien.

Gegenüberstellung der Ergebnisse bei den einzelnen Methoden

	Panopt.	Atebrin	Acror. cytol.			Acror.hist.
			prescr.	morph.	komb.	
Richtige Diagnose	38 (76%)	9 (20%)	46 (92%)	46 (92%)	47 (94%)	72 (96%)
positiv	31 (62%)	-	41 (82%)	35 (70%)	36 (72%)	59 (78,6%)
wahrscheinl.positiv	-	5 (11,1%)	-	4 (8%)	4 (8%)	1 (1,3%)
fälschlich positiv	-	-	2 (4%)	-	-	-
negativ	6 (12%)	4 (8,8%)	5 (10%)	7 (14%)	6 (12%)	12 (16 %)
wahrscheinl.negativ	1 (2%)	-	-	-	1 (2%)	3 (4 %)
fälschlich negativ	9 (18%) 3 (6 %)	36 (80%)	2 (4%)	4 (8%)	3 (6%)	-
Falsche Diagnose	12 (24%)	36 (80%)	4 (8%)	4 (8%)	3 (6%)	-

Diskussion

Welche Bedeutung können wir nun aufgrund unserer Untersuchungen den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungsmethoden bei der Diagnostik von Hautkarzinomen beimessen und welche Vor- und Nachteile bieten diese Methoden gegenüber den bisher gebräuchlichen Untersuchungsmethoden?

Im Gegensatz zu den von HENNING und WITTE (50, 102, 103) beschriebenen Ergebnissen bei der Cytodiagnostik von Karzinomen des Verdauungstrakts mithilfe der intravitalen Atebrinfluorochromierung muß diese bei der Diagnostik von Hautkarzinomen als unbrauchbar bezeichnet werden.

Die Verabreichung des sehr intensiv gelbfärbenden Atebrinfarbstoffes per os wird naturgemäß im Verdauungstrakt, besonders am Ort der Resorption, zu einer unmittelbaren intensiven Färbung der Zellen und wegen der besonderen Affinität der Karzinomzellen zu den Acridinfarbstoffen zu starker Fluorochromierung gerade letzterer Zellen führen. Die Folge ist eine ausgeprägte Sekundärfluoreszenz in Form von gelben cytoplasmatischen Granula. Offensichtlich handelt es sich hierbei um eine Kontaktfärbung in situ.

Anders ist es bei dem Versuch der Anfärbung der Hautkarzinomzellen durch perorale oder parenterale Gaben von Atebrin. Die Resorption ist bei den meist in fortgeschrittenem Alter stehenden Trägern von Hautkarzinomen der erste Unsicherheitsfaktor. Zum zweiten reicht offenbar die angebotene Farbstoffmenge nicht aus, um bei zwangsläufiger diffuser Verteilung des Farbstoffes im gesamten Organismus in der Karzinomzelle noch eine genügende Anreicherung zu erzielen. Die zugeführte Atebrinmenge kann aber ohne unerwünschte Nebenwirkungen nicht beliebig erhöht werden.

Lediglich bei sehr großen, exulcerierten und rapid wachsenden Karzinomen läßt sich eine schwache Fluoreszenz beobachten, die offenbar auf die Aufnahme von Atebrin durch die Karzinomzelle zurückzuführen ist, da bei den Voruntersuchungen eine wesentliche Eigenfluoreszenz in der Regel weder bei normalen, noch bei maligne veränderten Einzelzellen zu beob-

achten war. Die durch Atebrinfluoreszenz in diesen Fällen zu erzielende schwache grünliche Sekundärfluoreszenz ist aber nicht so ausgeprägt, daß sich diagnostische Schlüsse ohne Zuhilfenahme anderer Färbungen oder Untersuchungsmethoden, z.B. der Phasenkontrastbeobachtung, ergeben.

Wird dagegen, wie es in den Voruntersuchungen gelegentlich geschah, der Atebrinfarbstoff direkt auf den karzinomverdächtigen Herd in situ aufgetragen, dann kann ebenfalls eine stärkere Gelbgrünfluoreszenz der Krebszellen beobachtet werden. Gleichzeitig fluoreszieren dann auch andere vorkommende Zellen, z.B. Leukocyten, Bindegewebszellen etc. grünlich. Diese Methode könnte nach Überprüfung an größerem Untersuchungsmaterial evtl. zu einer Bereicherung der cytologischen Untersuchungsmethoden der Haut beitragen, gestaltet sich allerdings methodisch etwas schwierig, da es sich um Nativpräparate handelt, die durch das blaue oder ultraviolette Erregerlicht rasch irreversibel geschädigt werden. Insgesamt betrachtet, bietet sie nach unseren bisherigen Erfahrungen keine Vorteile gegenüber der Acridinorangefluorochromierung.

Die intravitale Atebrinfluorochromierung mit der in der Arbeit beschriebenen Methode stellt jedenfalls für die Cytodiagnostik der Hautkarzinome keine brauchbare diagnostische Methode dar.

Hingegen hat sich die Methode der cytologischen Acridinorangefluorochromierung als sehr geeignet für die Cytodiagnostik der Hautkarzinome erwiesen. Diese Methode ist einfach, ohne großen Zeitaufwand und jede einzelne Untersuchung rasch und wiederholt reproduzierbar. Die geringfügigen verwendeten Farbstoffkonzentrationen und der einfache Färbevorgang führen infolge der Fluoreszenzmetachromasie zu leuchtenden, farbkräftigen, polychromen Zellbildern. Störungen in der Beobachtung durch Blutbeimengungen sind wegen der fehlenden Fluoreszenz der Erythrocyten nicht zu befürchten. Cytomorphologische Struktureinzelheiten lassen sich gut beurteilen. Die zu beurteilenden Zellen werden in dem dunklen Gesichtsfeld rasch aufgefunden, zumal sie sich in der Regel durch

Rotfluoreszenz des Cytoplasmas oder zumindestens durch verstärkte Gelbgrünfluoreszenz der Kerne von anderen vorkommenden Zellen abheben. Diesen Vorzügen stehen folgende Nachteile gegenüber (zusammenfassende Übersicht Tab. 1, S. 7): Völlig befriedigende Dauerpräparate können nicht erzielt werden, da einerseits das Umrandungsmedium in das Eindeckungsmedium und andererseits der Farbstoff in das Eindeckungsmedium diffundieren. Die Fluoreszenzfarben blassen bei langer Beobachtung ab, offensichtlich mitbedingt durch die Tatsache, daß allgemein die Fluoreszenz bei steigender Temperatur schwächer wird, möglicherweise auch zusätzlich durch strukturelle Veränderungen infolge der längeren UV-Lichteinwirkung. Panoptisch umgefärbte Präparate nach Entfärbung mit 50 %igem Alkohol entsprechen in der Qualität nicht ganz den primär panoptisch gefärbten Präparaten. Anhäufungen von Zellen können bei heller Fluoreszenz Überstrahlungen aufweisen und so die Beobachtung von Struktureinzelheiten stören; allerdings ist es auch bei anderen Färbungen nicht immer möglich in Zellhaufen jede einzelne Zelle genau zu beurteilen. Bei langer Beobachtung der in Pufferlösung eingedeckten Präparate kann es neben der Farbabblassung zu Auskristallisationen kommen, die die Beobachtung stören können.

Bei den von uns vorgenommenen Untersuchungen konnten von 50 Fällen mithilfe der cytologischen Acridinorangefluorochromierung 47 Fälle richtig diagnostiziert werden (94%), davon wurden 42 eindeutig und 5 wahrscheinlich als richtig erkannt. Bei diesen Ergebnissen wurden sowohl die cytoplasmatische Rotfluoreszenz als auch die cytomorphologischen Details der Zellen bewertet. Allein mit der Bewertung der Rotfluoreszenz oder mit der morphologischen Betrachtungsweise wurden fast gleiche Ergebnisse erzielt. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen der einzelnen Methoden erweist sich bei der Überprüfung nach den üblichen statistischen Methoden als nicht signifikant, da die Differenz der Werte in dem errechneten Zufallsbereich des Zahlenmaterials liegt. (Verläßlichkeitsintervall für Differenzen zwischen Prozentwerten). (Gegenüberstellung der Ergebnisse der einzelnen Methoden siehe Tabelle

Seite 59 und Diagramm 5 und 6).

Eine besonders von amerikanischer Seite geübte Unterteilung in "prescreening" und morphologische Beurteilung ist nach unseren Erfahrungen auch nicht wünschenswert und bei einem geschulten Beobachter gar nicht möglich. Wie aus theoretischen Überlegungen klar hervorgeht und schon wiederholt erwähnt wurde, ist die Gefahr falscher positiver oder negativer Ergebnisse bei der alleinigen Beurteilung nach der Farbe grösser. Dies wird auch bei unseren Untersuchungsergebnissen angedeutet, da allein bei dieser Methode fälschlich positive Resultate erzielt wurden. Solche Fehlresultate wären im größeren Umfang zu erwarten, wenn, wie verschiedentlich angestrebt, cytologisch ungeübte Beobachter, z. B. Laboratoriumshilfskräfte, die Vorauswahl der Präparate nach der Farbe vornehmen würden. Bei cytologisch geübten und erfahrenen Untersuchern wird stets jedes Kennzeichen, das die Diagnosestellung fördert, zur Beurteilung herangezogen werden, sodaß sich die kombinierte Betrachtungsweise von selbst ergibt.

Mittels der Acridinorangefluorochromierung cytologischer Präparate ist es nach unseren Untersuchungen möglich, unter Berücksichtigung der Standartabweichung der Streuung von Prozentwerten einer Stichprobe, mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit bei mindestens 85 % aller zu untersuchenden Fälle die richtige Diagnose zu stellen. (Der aus der Stichprobe von 50 Fällen errechnete allgemeine Prozentwert für die richtige Beurteilung liegt zwischen 85 und 103 %). Somit ist diese Methode der Papanicolaoufärbung in Bezug auf die Treffsicherheit gleichzusetzen.

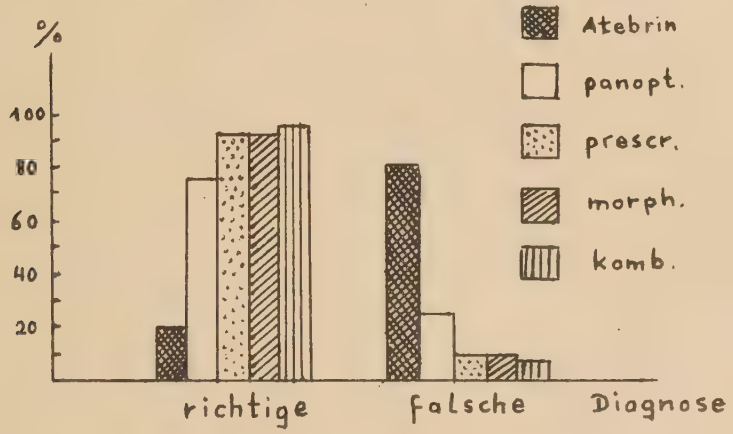
Die bei den panoptischen Kontrolluntersuchungen erzielten, statistisch signifikanten, schlechteren Ergebnisse, die außerhalb des bei unserem kleinen Zahlenmaterial mit +- 6,94% relativ großen Zufallsbereiches liegen, erklären sich offensichtlich dadurch, daß einzelne Zellen mit Malignitätskriterien bei beginnenden karzinomatösen Veränderungen in den zellarmen, panoptisch gefärbten Ausstrichen nur sehr schwierig aufgefunden werden. Dies kommt in 24 % fälschlich nega-

tiven Ergebnissen bei dieser Methode zum Ausdruck (s.Diagramm 5). Bei der Methode der cytologischen Acridinorangefluorochromierung wird dagegen der Beobachter in den meisten Fällen durch die vorhandene cytoplasmatische Rotfluoreszenz die fraglichen Zellen rasch und sicher auffinden und beurteilen können. Fortgeschrittene Hautkarzinome können auch mit der panoptischen Färbung bei der entsprechenden Methodik meist leicht diagnostiziert werden.

Diagramm 5 : Vergleich der Acridinorangefluorochromierung und der panoptischen Färbung

Die Acridinorangefluorochromierung histologischer Präparate erwies sich als gleichwertig gegenüber der konservativen histologischen Methodik, da die dabei gestellten Diagnosen durchwegs durch die klinischen histologischen Routineuntersuchungen bestätigt wurden. Die Kriterien der Beurteilung waren dabei die gleichen. Aufgrund der Fluoreszenzfarben allein ließen sich keine Aussagen über Gut- oder Bösartigkeit bestimm-

ter Gewebspartien machen. Allein schon wegen der Brillianz der Farben und des Kontrastreichtums verdient die Methode Beachtung; wesentliche neue Gesichtspunkte bei der histologischen Diagnostik von Hautkarzinomen ergaben sich dabei aber nicht. Ob damit bei anderen pathologischen Hautveränderungen gegenüber der bisher üblichen Methodik bessere Ergebnisse zu erzielen sind, ist nach den bisher vorliegenden Untersuchungen nicht abzusehen.



6.Diagramm: Vergleich der Ergebnisse der einzelnen durchgeführten Methoden:

Es besteht zunächst kein Anlaß, die bisher angewandte histologische Methodik durch die histologische Acridinorangefluorochromierung zu ersetzen. Für Schnelldiagnosen eignet sich die Acridinorangefluorochromierung von Gefrierschnitten (FLEGEL (26,27), HAMPERL (zit.b.FLEGEL), HARTMANN (26)) wegen der raschen Herstellung der Präparate sehr gut, ist allerdings mit den allgemein bekannten Nachteilen der Gefrierschnittmethode in gleicher Weise behaftet. Hinzu kommt, daß es immer noch nicht gelungen ist,bei der Acridinorangefluorochromierung histologischer Schnitte Dauerpräparate herzustellen.

Da es sich bei unseren Untersuchungen vorwiegend um cytologische Methoden handelte und auch nur diese signifikante Unterschiede gegenüber den bisher gebräuchlichen Methoden zeigten, ist zum Schluß noch die Frage aufzuwerfen, ob die Cytodiagnostik der Hautkarzinome bei der leichten Zugänglichkeit der Haut für die histologische Untersuchung überhaupt eine Berechtigung hat.

Unseres Erachtens ist diese Frage zu bejahen, wobei hervorgehoben werden muß, daß die Cytodiagnostik keine Konkurrenz- sondern eine Ergänzungsmethode der histologischen Untersuchung darstellt und darstellen soll.

Die einfache Methodik, die geringe Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens des zu untersuchenden Patienten und die beliebig häufige Reproduzierbarkeit prädestinieren sie zu einer orientierenden Routineuntersuchung. Daß die Aussagekraft der cytologischen Diagnose noch nicht die Sicherheit und allgemeine Anerkennung der histologischen Untersuchung erlangt hat, liegt zum großen Teil offensichtlich daran, daß die Methode bisher zu wenig angewendet und deshalb sowohl den Untersuchern als auch besonders den Klinikern noch zu wenig vertraut ist. Überprüfung an größerem Untersuchungsmaterial und evtl. Verbesserung der Methodik sowie häufigere Anwendung im regulären Klinikbetrieb könnten hier Abhilfe schaffen. Daß eine hohe Treffsicherheit bei den cytologischen Untersuchungsmethoden erlangt werden kann, beweisen neben unseren eigenen Untersuchungen die vielseitigen cytologischen Untersuchungen in anderen medizinischen Fachgebieten, insbesondere in der Gynaekologie. Die anfänglichen Schwierigkeiten bei der Beschäftigung mit cytologischen Untersuchungen dürfen dabei nicht abschrecken, da HARTMANN (46) ganz richtig betont, daß die"Schwierigkeiten in der cytologischen Untersuchung nicht prinzipiell, sondern graduell sind".

Zudem gibt es unseres Erachtens geradezu bestimmte "Indikationen" für die cytologische Karzinomdiagnostik der Haut. Dies sind vor allem karzinomverdächtige Hautveränderungen an Körperstellen, die den chirurgischen Eingriffen nur

schwer zugänglich sind oder bei denen evtl. stärkere narbige Veränderungen oder kosmetische Beeinträchtigungen zu erwarten sind, die dann, wenn kein Karzinom vorliegt, hätten vermieden werden können. Besonders gilt dies vielleicht für Veränderungen in Augennähe, an der Lippe und an der glans penis. Eine weitere Indikation ist u.U. die cytologische Lymphknotendiagnostik, z.B. bei Metastasenverdacht.

Der Patient empfindet es oft als "angenehmer", wenn zunächst eine kaum störende Untersuchungsmethode angewendet wird und nicht sofort der chirurgische Eingriff, der oft zu Unrecht gefürchtet wird, droht. Bei entsprechender Verdachtsdiagnose durch die rasch vorgenommenen cytologischen Untersuchungen sieht er die Notwendigkeit zu evtl. chirurgischen Eingriffen, die dann oft sofort umfassender sein können, viel eher ein.

Die guten Ergebnisse zusammen mit den angeführten Gründen sind nach unserer Meinung ausreichend, um eine allgemeine Anwendung der Cytodiagnostik der Hautkarzinome zu fordern. Zur Sicherung der Diagnose wird von vielen Autoren in jedem Fall eine histologische Untersuchung verlangt. Generell ist dies unbedingt anzustreben, da bei der folgenschweren Diagnose "Krebs" jede verfügbare Untersuchungsmethode zur Bestätigung und Erhärtung der Befunde angewendet werden sollte. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Falles wird die Entscheidung gefällt werden müssen, obschon eine der beiden Untersuchungen ausreichend ist. Oberstes Prinzip ist, unter allen Umständen eine einwandfreie Diagnose zu sichern. Gerade auf dem Gebiet der Krebsdiagnostik sollte kein möglicher Weg unbeschritten bleiben.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Verwendungsmöglichkeit und der Nutzen der Fluoreszenzmikroskopie bei der Diagnose von Hautkarzinomen anhand eigener Untersuchungen überprüft.

Es wurden dabei 2 cytologische und 1 histologische Methode verwendet:

Bei 45 Patienten, die klinisch als Hautkarzinome imponierende Hautveränderungen aufwiesen, wurde versucht, durch intravitale Fluorochromierung mit Atebrin eine signifikante Fluoreszenz der Krebszellen zu erzielen. Die Methode erwies sich als ungeeignet.

Bei 50 Fällen wurden vom Herd oder von der Probeexcision abgenommene Tupf- oder Ausstrichpräparate nach Fixierung in Aether-Alkohol mit Acridinorange fluorochromiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Anhand einer meist vorhandenen cytoplasmatischen Rotfluoreszenz, einer vermehrten nukleären Gelbgrünfluoreszenz und charkteristischer morphologischer Kennzeichen der Karzinomzellen konnte in 47 von 50 Fällen (94 %) die richtige Diagnose gestellt werden, was einer Treffsicherheit von mindestens 85 % entspricht. Die Methode der cytologischen Acridinorange fluorochromierung ist daher für Untersuchungen an Hautkarzinomen sehr geeignet und ihre Verwendung zu empfehlen.

Bei 75 Patienten, deren Hautveränderungen klinisch als ausgeprägte oder beginnende Hautkarzinome anzusprechen waren, wurden nach einer Probe- oder Totalexcision die bis zur Paraffinfineinbettung normal verarbeiteten Schnitte nach Entparaffinierung mit Acridinorange fluorochromiert, in Paraffinöl eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es gelang hier ebenso wie mit der bisher üblichen Methodik die richtige Diagnose zu stellen. Wesentliche neue Gesichtspunkte in der Beurteilung ergaben sich dabei aber nicht.

Schrifttum

1. Albertini, A.v.: zitiert bei H. Lüdin
2. Appelt, H.: Einführung in die Mikroskopischen Untersuchungsmethoden. Geest und Portig, Leipzig 1953.
3. Armstrong, J.A.: Exp. Cell. Res. 11 : 640 (1956).
4. Ayre, J.E.: Amerc. Med. Assoc. 136: 513 (1948).
5. Ayre, J.E.: Dtsch. Med. Wschr. 74: 31 (1949).
6. Bertalanffy, F.D.: Mikroskopie 15: 67 (1960).
7. Bertalanffy, F.D.: Triangel Sandoz 3: 152 - 155 (1961).
8. Bertalanffy, F.D.: Canc.Res. 21: 422 (1961).
9. Bertalanffy, L.v.: Klin. Wschr. 37: 469 - 471 (1959).
10. Bertalanffy, L.v. u. F.D.: Naturwiss. 47: 165 - 166 (1960).
11. Bertalanffy, L.v. u. F.D.: Med. Welt 35: 1742-1751 (1961).
12. Bertalanffy, L.v. u. I. Bickis: J. Histochem. Cytochem.4: 481 - 493 (1956).
13. Bertalanffy, L.v., M. Masin u. F. Masin: Cancer 11: 873 (1958).
14. Bruntsch, K.H.: Med. Klin. 41: 1744 - 1746 (1956).
15. Bukatsch, F. u. M. Haitinger: Protoplasma 34: 515 (1940).
16. Butenandt, A. u. H. Dannenberg: Handb. Allg. Path. Bd.6/3: 107, Springer, Heidelb.1956.
17. Cardozo, P.L.: Klinische Cytologie. In: Linke A. u. K.H. Bauer: Früherkennung des Krebses. Friedrich-karl Schattauer-Verl., Sttgt. 1962 S.77-130.
18. Caspersson, T. u. C. Santesson: Act. Radiol. Stockh. Suppl. 46 (1942).
19. Choné, B.: Münch. Med. Wschr. 14: 21 - 23 (1962).
20. Coman, D.R.: Canc. Res. 4: 625 (1944).
21. Dart, L.H. u. T.R. Turner: Lab. Invest. 8: 1513-1522 (1959).
22. Domagk, G.: Münch. Med. Wschr. 17/18: 734 (1950).
23. Elevitch, F.R. u. J.G. Brunson: Amer. J. Path. 35: 688 - 698 (1959).
24. Elevitch, F.F. u. J.G. Brunson: Surg., Gynec. Obstet. 112: 3 (1961)
25. Ferguson, J.H.: Cancer (N.Y.) 2: 845 - 852 (1949).
26. Flegel H.: Arch. f. Dermat. u. Syph. 194: 136 - 151 (1952).

27. Flegel, H.: Arch. f. Dermat. u. Syph. 194: 152 - 163 (1952).
28. Flegel, H.: Wiss. Z. d. Friedrich-Schiller-Univ. Jena, Mathematisch-naturwissensch. R. 3: 475 - 477 (1953/1954).
29. Gans, O. u. G.K. Steigleder: Histologie der Hautkrankheiten 2 Bde. Springer-Verlag, Berlin 1957.
30. Gladstone, S.A.: Arch. Derm. a. Syph. 62: 380 (1950).
31. Gössner, W.: Verh. Dtsch. Ges. Path. 33: 101-109 (1949).
32. Gottschewski E.H.M.: Sonderdruck aus "Mikroskopie" Bd. 9, 5/6: 147 - 167 (1954).
33. Graffi, A.: Zschr. Krebsforsch. 52: 165 (1941).
34. Grunze, H.: Intern. Sympos. ü. Klin. Cytodiagnostik 1957. S. 99-116, Thieme-Verlang, Stuttgart 1958.
35. Hagemann, P.K.H.: Münch. Med. Wschr. 85: 1066 (1938).
36. Hamperl H. u. M. Haitinger: Zschr. mikrosk.-anat.Forsch. 33: 193 (1933).
37. Haitinger M.: Fluoreszenzmikroskopie. Leipzig 1938.
38. Hamperl, H.: Virchows Arch. path. Anat. 292: 1 (1934).
39. Hamperl, H.: Med. Klin. 39: 781 (1943).
40. Hamperl, H.: Pathol.-histol. Praktikum. Springer-Verlag, Berlin 1944.
41. Hamperl, H.: Mikroskopie 2: 152 (1947).
42. Hamperl, H.: Verh. Dtsch. Ges. Path. 35. Tagung S.29 (1951).
43. Hamperl, H.: Münch. Med. Wschr. 97: 1121 (1955).
44. Hamperl, H.: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. Springer, Bln. 1954.
45. Hamperl, H.u. N. Schümmelfeder: Ciba-Symposium. Bd. 9/2: 50 - 63 (1961).
46. Hartmann,P.: Dtsch. Med. Wschr. 80: 1839 - 1850 (1955).
47. Haug, H.: Leitfaden der mikroskopischen Technik. Thieme-Verlag. Stuttgart 1959.
48. Hauser, W.: Arch. f. klin. u. exp.Derm.210:339-354 (1960).
49. Henning., N.:Klinische Laboratoriumsdiagnostik. Urban und Schwarzenberg. München u. Berlin (1959).
50. Henning, N. u. S. Witte: Intern. Sympos. ü. klin. Cytodiagnostik 1957. Hrsg. v. Henning N.u. S. Witte. Thieme-Verlang Stuttgart 1958. S. 147 ff.

51. Holland, J.C. u. M.R. Ackermann:Obstetr.Gynec.17:38(1961).
52. Kahlau, G.: Erg. allg. Path. 37:(1954).
53. Kahlau, G.: Mitteilungsdienst der Gesellschaft zur Bekämpf. d. Krebskrankheiten(MBK) 8,Bd.II(1962).
54. Knoth, W.: Arch. f. klin. u. exp. Dermat. 201 : 106 - 123 (1955)
55. Knoth, W., R. Hermann u. W. Meyerhöfer: Arch. f. klin. u. exp. Dermat. 209: 194 - 199 (1959/60).
56. Kosenow, W.: Suppl.ad.Act.haemat.Fasc. 4 (1956).
57. Kosenow, W. u. H. Mai : Z. Kinderheilk.70: 552-560(1952).
58. Kraushaar, O.F.: zitiert bei Navratil E.
59. Linke, A. u. K.H. Bauer : Früherkennung des Krebses. Friedrich-Karl Schattauer Verl., Stuttgart 1962.
60. Lipschütz, B.: Virchows Archiv 282: 107 - 157 (1931).
61. Lüdin, H.: Schweiz. Med. Wschr. 78: 710 (1948).
62. Meesen, H.: Ärztl.Forsch.Wörrishofen 8: 481 (1954).
63. Mellors, R.C.: Analytical Cytology.R.C.M. N.Y.-Toronto-London 1955.
64. Mellors, R.C., A. Glassman u. G.N. Papanicolaou : Cancer (N.Y.) 5: 458 - 468 (1952).
65. Merényi, D.: Dtsch.Med. Wschr. 2: 45 - 52 (1949).
66. Mohr, H.J.: Intern.Sympos.ü.klin.Cytodiagnostik 1957. Thieme-Verlag.Stuttgart 1958.S.36-38.
67. Navratil, E.: Seitz-Amrein: Biologie und Pathologie des Weibes. Bd.4. München 1955. S.675.
68. Papanicolaou, G.N. u. H.F. Traut : Diagnosis of uterin cancer by the vaginal smear. N.Y.1943.
69. Raskin, J.: Arch.Dermat. 82: 965 (1960).
70. Riegel, R.: Intern.Sympos.ü.klin.Cytodiagnostik 1957. Thieme Verl. Stuttgart 1958. S.99 - 116.
71. Romeis, H.: Mikroskopische Technik. Leibnitz Verlag. München 1948.
72. Roulet, F.: Methoden der pathologischen Histologie. Springer Verlag. Wien 1948.
73. Rudolf, W.: Med. Klinik 22: 1063 (1959).
74. Runge, H.; Vöge A. u.H.Haselmann : Geburts. u. Frauenheilk. 9: 627 (1946).

75. Sandritter, W.: Pathol.-anat. Frühdiagnostik. In: Linke,A: Nr.59, S.43 -73.
76. Schneider, W.C. u. H.L. Klug : Cancer Res. 6:691-694(1946)
77. Schöldgen, W.: Arch. f. klin. u. exp. Dermat. 201: 556 - 563 (1955).
78. Schümmelfeder, N.: Acta Histochem. Suppl. 1: 148 (1948).
79. Schümmelfeder, N.: Naturwiss. 35: 346 (1948).
80. Schümmelfeder, N.: Naturwiss. 36: 58 (1949).
81. Schümmelfeder, N.: Virchows Arch. 318: 119-154 (1950).
82. Schümmelfeder, N.: Mitteilungsdienst der Gesellschaft z. Bekämpfung der Krebskrankheiten 7: 457 - 481 (1962).
83. Schümmelfeder, N., K.J.Ebschner u. E.Krogh : Naturwiss. 44: 467 - 468 (1957).
84. Schümmelfeder, N., G. Kern u. E. Kern-Bontke : Mitteilungsdienst der Gesellsch. z. Bekämpf. der Krebskrankh. 7: 482-502 (1962).
85. Schümmelfeder, N. u. W. Schümmelfeder: Z. Krebsforsch. 59: 223 - 229 (1953).
86. Schümmelfeder,N. u. K.F. Stock : Naturwiss.42: 42(1955).
87. Sjöstrand, F.: Über die Eigenfluoreszenz tierischer Gewebe mit besonderer Berücksichtigung der Säugetiere. Stockholm 1944.
88. Straus, F.H., N.D. Cheronis u. E. Straus: Science 108: 113 - 115 (1948).
89. Streicher, H.J. u. Sandkühler : Klinische Cytologie. Thieme Verlag. Stuttgart 1953.
90. Strugger, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M.&H. Sdhaper 1949. Hannover.
91. Sussmann, W.: Obstet. Gynec.(N.Y.) 13: 273-277 (1959).
92. Sussmann, W.: Obstet. Gynec.(N.Y.) 82: 1273 (1961).
93. Swanson, C.S.: Cytologie und Cytogenetik. Fischer Verlag. Stuttgart 1960.
94. Tzank, A.: Bull. Soc. franc. Derm. Syph.54: 68 (1947).
95. Umicker, W., L. Pickle u. B. Waite: Brit.J.Canc.13: 398 - 402 (1959).
96. Undritz, E.: Intern Sympos. ü. klin. Cytodiagnostik 1957. Thieme Verlag.Stuttgart 1958. S.61 - 74 .

97. Walz, W.: Dtsch.Med. Wschr. 46: 1559 (1950).
98. Warburg, O.: Über den Stoffwechsel von Tumoren. Springer-Verlag. Berlin 1926.
99. Wellmann, K.F.: Münch.Med.Wschr. 31: 1428 - 1431 (1962).
100. Winer, L.H. u. C.E. Lipschulz: Arch. Derm.a.Syph. 65: 270 (1952).
101. Witt, H.J.: Münch. Med. Wschr. 99: 1902 (1957).
102. Witte, S.: Verh. d. Dtsch. Ges. f. Innere Med. 61. Kongr.
103. Witte, S.: Intern. Sympos. ü. klin. Cytodiagnostik 1957. Thieme Verlag. Stuttgart 1958. S. 147 ff.
104. Wittekind, D.: Intern. Sympos. ü. klin. Cytodiagn. 1957. Thieme Verlag. Stuttgart.1958. S.44-47.
105. Zeiger, K. u. H. Harders : Zschr. Zellforsch. 36: 62 - 78 (1951).
106. Zeiger, K. u. H. Harders : Protoplasma 40: 76 - 84 (1951).
107. Zierz, P.: Frühdiagnose der Hautkarzinome. In : A.Linke: Früherkennung d. Krebses. s.Nr.59. S.425-441.
108. Zoon, J.J. u. J.W.H. Mali : Dermatologica (Basel), 101, 154, (1950).

Statistische Auswertung nach:

Henrysson, St., O.W. Haseloff u. H.J. Hoffmann: Kleines Lehrbuch der Statistik. Walter de Gruyter & Co . Berlin 1960.

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. C. M. Hasselmann, Direktor der Universitätshautklinik Erlangen, für die Überlassung der Arbei, seine wohlwollende Unterstützung und die Übernahme des Referates meinen herzlichen Dank aussprechen.
Gleichzeitig möchte ich Herrn Prof. Dr. med. C. M. Hasselmann und Herrn Dr. med. V. Aplas für die Überlassung der histologischen Untersuchungsbefunde aus den laufenden klinischen histologischen Untersuchungen danken.

Lebenslauf

Ich, Heinz Erich Münnich, wurde am 9.5.1933 als Sohn des damaligen Polizeiwachtmeisters Erich Münnich und seiner Ehefrau Katharina, geb. Harz, in Nürnberg geboren.

Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Volksschule und von 1943 bis 1952 das Melanchthon-Gymnasium in Nürnberg. Diese Ausbildung wurde durch ein Jahr Evakuierung 1944/45 und durch einen einjährigen Aufenthalt an der Montgomery-Blair-High-School, Silver-Springs, Md., USA, 1950/51 als Austauschschüler unterbrochen.

Nach der Reifeprüfung am Melanchthon-Gymnasium in Nürnberg im Jahre 1952 begann ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, wo ich 1955 das Physikum und 1959 das Staatsexamen ablegte.

Als Medizinalassistent war ich am Städt. Krankenhaus Forchheim, am Kreiskrankenhaus Scheßlitz und am Kreiskrankenhaus Haßfurt tätig. Die Approbation wurde mir mit Wirkung vom 28. Febr. 1961 erteilt. Am letztgenannten Krankenhaus verblieb ich auf der medizinischen Abteilung bis zum September 1961. Seit 1. Okt. 1961 bin ich an der Universitätshautklinik Erlangen tätig.